

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«___» _____ 2020 р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

**на тему: «Технологія виробництва бактеріальної пробіотичної закваски
«Стрептосан». Дільниця виробничого біосинтезу»**

Виконав (-ла):

студент (-ка) IV курсу, групи БТ-61

Іванова Анастасія Олегівна _____

Керівник:

Доцент, к.б.н., доцент,

Жолнер Лілія Григорівна _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення
технологічного процесу:

Доц. каф. біотехніки та інженерії, к.т.н.,

Шибецький Владислав Юрійович _____

Рецензент:

Ас. каф. екобіотехнології та біоенергетики, к.т.н.,

Левтун Ігор Ігорович _____

Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.

Студент (-ка) _____

Київ – 2020 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

[illegible]

				ДП БТ6108 00.000.00		
	ПІБ	Підп.	Дата	Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Розробн.					2	129
Керівн.					КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-61	
Консульт.						
Н/контр.						
Зав.каф.	Тодосійчук Т.С.					

**Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»**

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«_27_» лютого 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Івановій Анастасії Олегівні

1. Тема проєкту «Технологія виробництва бактеріальної пробіотичної закваски «Стрептосан». Дільниця виробничого біосинтезу», керівник проєкту Жолнер Лілія Григорівна, к.б.н, доц., затверджені наказом по університету від «21» травня 2020 р. № 1125-с

2. Термін подання студентом проєкту _____

3. Вихідні дані до проєкту: асоціація штамів-продуцентів *Streptococcus thermophilus* та *Enterococcus faecium*; середовище культивування – знежирене молоко; ферментер для промислового культивування - об'єм 1,0 м³; параметри культивування: $t = 37 \pm 1$ °C, аерація відсутня, $\tau = 12$ год; кінцевий продукт – суха ліофільно висушена біомаса продуцентів у флаконах для харчової промисловості.

4. Зміст пояснювальної записки: охарактеризувати продуценти для виробництва бактеріальної полівидової пробіотичної закваски; провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проєкті;

визначити основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну і апаратурну схему виробництва; обґрунтувати вибір конструкції ферментеру, здійснити його технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду виробничого ферментеру – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1

6. Консультанти розділів проєкту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Шибєцький В.Ю., доцент каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	01.04.20 — 14.04.20	
2.	Біохімічні основи виробництва	01.04.20 — 14.04.20	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	01.04.20 — 14.04.20	
4.	Технологічна частина	14.04.20 — 22.04.20	
5.	Складання апаратурної схеми	14.04.20 — 27.04.20	
6.	Охорона праці	28.04.20 — 15.05.20	
7.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	28.04.20 — 15.05.20	
8.	Оформлення пояснювальної записки	не пізніше 10 червня	

Студент

Анастасія Іванова

Керівник

Лілія Жолнер

**Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва бактеріальної
пробіотичної закваски «Стрептосан». Дільниця
виробничого біосинтезу»**

Київ – 2020 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проєкт: 129 с., 14 рис., 8 табл., 2 схеми, 1 креслення, 206 посилань.

У дипломному проєкті наведено опис технології виробництва біотехнологічного препарату на основі молочнокислих бактерій на прикладі пробіотичної закваски «Стрептосан», до складу якої входить асоціація біологічних агентів *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophiles* та *Enterococcus faecium*.

Запропоновано поєднання апробованих промислових продуцентів в одному пробіотичному препараті, що дозволяє підвищити його ефективність та розширити корисний потенціал продукту.

Обґрунтовано вибір штамів-продуцентів *Streptococcus thermophilus* 1MB B-7179 та *Enterococcus faecium* L-3, отриманих шляхом спрямованої селекції видів, виділених з природних джерел існування, та володіють пробіотичними властивостями і є високотехнологічними.

Розраховано та обрано апарат для культивування асоціації продуцентів, надійність та працездатність якого підтверджено технологічним, конструктивним та тепловим розрахунками.

В роботі обґрунтовані та подані технологічна та апаратурна схема виробництва.

МОЛОЧНОКИСЛІ БАКТЕРІЇ, ЗАКВАСОЧНІ КУЛЬТУРИ,
ПРОБІОТИЧНІ МІКРООРГАНІЗМИ, ENTEROCOCCUS FAECIUM,
STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS, КУЛЬТИВУВАННЯ.

ABSTRACT

Thesis project: 129 pp., 14 fig., 8 tab., 2 schemes, 1 drawing, 206 references.

The thesis project describes the production technology of a biotechnological preparations based on lactic acid bacteria using the example of the probiotic bacterial starter "Streptosan", which includes the association of biological agents *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophiles* and *Enterococcus faecium*.

The combination of proven industrial producers in one probiotic preparation is proposed, which allows to increase its efficiency and expand the useful potential of the product.

The choice of producer strains *Streptococcus thermophilus* 1MB B-7179 and *Enterococcus faecium* L-3, which obtained by targeted selection of species isolated from natural sources of existence and have probiotic and high-tech properties is reasoned.

The fermenter for cultivating an association of producers was calculated and chosen, the reliability and performance of which is confirmed by technological, constructive and thermal calculations.

The work substantiates and presents the technological and hardware scheme.

LACTIC ACID BACTERIA, STARTER CULTURES, PROBIOTIC MICROORGANISMS ENTEROCOCCUS FAECIUM, STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS, CULTIVATION.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	10
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	12
1.1. Основні промислові продуценти.....	12
1.2. Морфолого-цитологічні ознаки.....	16
1.3. Культуральні ознаки.....	16
1.4. Фізіолого-біохімічні ознаки.....	18
1.5. Серологічні ознаки.....	31
1.6. Поширення в природі.....	32
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА.....	35
2.1. Характеристика кінцевого продукту. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в результаті реалізації технології.....	35
2.2. Схема хімічних перетворень.....	36
2.3. Методи очистки цільового продукту.....	38
2.4. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси.....	39
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ.....	42
3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту.....	42
3.1.1. Наявність генетичних карт продуценту або типового представника групи.....	42
3.1.2. Вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів синтезу.....	45
3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту.....	50
3.3. Схема отримання продуцента, що використовується в роботі.....	59
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	63
4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва.....	63

4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві.....	67
4.3. Опис технологічного процесу.....	68
4.4. Матеріальний баланс.....	80
4.5. Контроль виробництва.....	81
4.6. Технологічна схема виробництва.....	86
РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ.....	87
5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату.....	87
5.2. Технологічний, конструктивний, тепловий розрахунки.....	92
5.3. Вибір загальнозаводського обладнання.....	99
5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.....	104
ВИСНОВКИ.....	107
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	108

ВСТУП

Здоров'я населення завжди займає одне з перших місць в системі життєвих цінностей будь-якої держави. Проблема збереження здоров'я суспільства та зниження захворюваності особливо гостро стоїть сьогодні перед Україною [1]. Зокрема, за різними даними хвороби органів травлення займають 3-4 місце по захворюваності населення України [2].

В даний час виробництво молочнокислих продуктів, що містить пробіотичні мікроорганізми, є поширеною і нагальною проблемою, що має комерційне значення [3]. Пробіотичні продукти харчування вважаються важливою частиною ринку функціональних продуктів харчування, так як вони складають від 60% до 70% всього ринку функціональних продуктів харчування [4]. Одним з напрямків оптимізації їхнього виробництва є поєднання апробованих промислових продуцентів в одному пробіотичному препараті, що дозволяє підвищити його ефективність та розширити корисний потенціал продукту. Біорізноманітність мікробіоти вказує на доцільність розробок у даному напрямі. Комплексні препарати можна розглядати як необхідний стратегічний напрям боротьби з багатьма поширеними інфекційними та деякими захворюваннями неінфекційного походження.

Біологічні відносини між заквасочними культурами можуть бути у формі синергізму або антагонізму. Оскільки пробіотичні бактерії не здатні у належній мірі зброджувати молоко і виробляти кисломолочні продукти з задовільними сенсорними властивостями, звичайною практикою є додавання до них традиційних бактерій йогурту (наприклад, *S. thermophilus*), що називається «підтримуючою культурою» або «додатковою культурою».

Наявність пробіотичних властивостей у *S. thermophilus* становить особливий інтерес, оскільки, на відміну від більшості пробіотиків, представлених на ринку, цей вид має величезне значення як технологічний стартер, який використовується у великих кількостях для виробництва сирів і кисломолочних продуктів.

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		10

Одним з відомих функціональних продуктів, що здатний нормалізувати ліпідний обмін та рівень холестерину у людей похилого віку є кисломолочний напій – Геролакт. Продукт отриманий на основі бактеріального препарату «Стрептосан» із включенням *Streptococcus thermophilus*, як сильного кислотоутворювача та *Enterococcus faecium*, як функціонального мікроорганізму, що входить до складу мікрофлори ротової порожнини, кишечника та сечостатевої системи. Використання останнього пояснюється високою здатністю до виживання, що в свою чергу створює можливості використання їх у різних технологічних процесах. Варто зазначити, що *Enterococcus faecium* проявляє геродієтичні властивості [5].

Культивування є однією з найбільш критичних стадій виробництва, а питання біосумісності обраних біологічних агентів полікомпонентних препаратів все частіше виходить на перший план. Тому метою дипломної роботи є оптимізація і проектування ділянки виробничого культивування, яка підкреслює значимість даної стадії технологічного процесу у виробництві бактеріальної пробіотичної закваски «Стрептосан».

Згідно з поставленою метою, необхідним було виконання ряду завдань:

- навести характеристику основних промислових продуцентів;
- розглянути особливості кінцевого продукту і методи його одержання;
- обрати схему отримання високопродуктивного продуценту для одержання цільового продукту;
- скласти матеріальний баланс, обрати технологічну і апаратурну схему виробництва бактеріальної пробіотичної закваски «Стрептосан», скласти перелік контрольних точок виробництва;
- обґрунтувати вибір конструкції апарату ділянки біосинтезу, здійснити технологічний та конструктивний розрахунки обраного апарату;
- провести аналіз шкідливих та небезпечних факторів виробництва, визначити відповідні вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		11

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1. Основні промислові продуценти

Сучасне визначення пробіотиків було дано робочою групою Всесвітньої організації охорони здоров'я у 2001 році та до сих пір зберігає свою актуальність [6]: «Пробіотики - це живі мікроорганізми, які при застосуванні в адекватних кількостях викликають поліпшення здоров'я організму-господаря». Більшість пробіотиків - це мікроорганізми, що відносяться до типових представників нормальної мікрофлори людини - лактобактерії, які є факультативними анаеробами, біфідобактерії - облигатні анаероби, а також представники субдомінуючих видів - *Streptococcus thermophilus*, *E. faecium* [7-9].

Коли пробіотики використовуються в якості закваски при виробництві кисломолочних продуктів, особлива увага приділяється деяким їх характеристикам (рис.1.1.1).

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Іванова А.О.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	12	129
						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівник		Жолнер Л.Г.						
Затвер.								



Рис.1.1.1 Характеристика заквасочних пробіотичних організмів у молоці [9].

У пробіотичних продуктах життєздатність пробіотичних мікроорганізмів до кінця терміну придатності є найбільш критичним критерієм [10]. Життєздатність пробіотиків в кисломолочних продуктах може істотно і помітно залежати від складу і чинників процесу як в процесі виробництва, так і під час зберігання в холодильнику (рис.1.2.) [11-13].

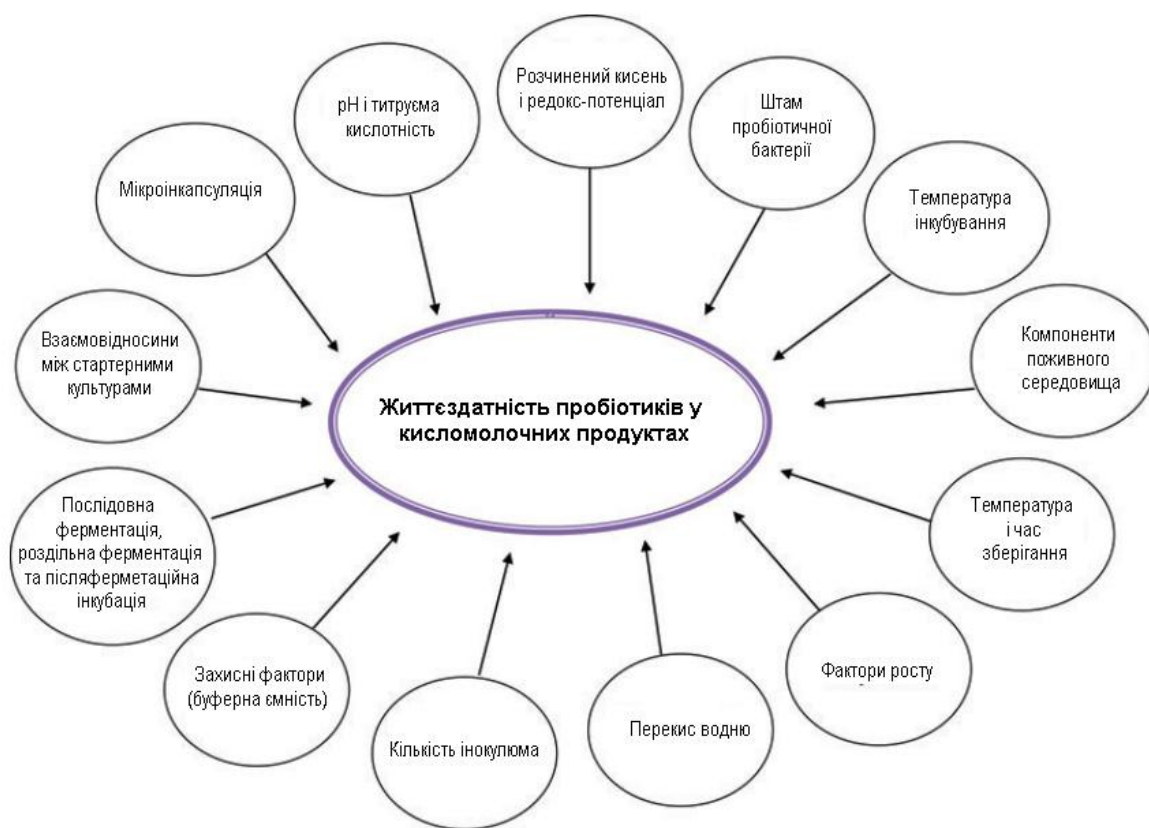


Рис.1.1.2. Основні фактори, що впливають на життєздатність пробіотиків у кисломолочних продуктах [12]

До пробіотиків, що мають доказову безпеку і ефективність, відносяться представники роду лактобактерій (*L. acidophilus* - штам *L. gasseri*; *L. rhamnosus* - штам *L. rhamnosus* GG; *L. plantarum* - штам *L. plantarum* 299 v; *L. reuteri*; *L. fermentum* - штам *L. fermentum* KLD; *L. lactis*; *L. casei* - штам *L. shirota*; *L. bulgaricum*), роду *Bifidobacterium* (*B. longum* - штам *B. infantis*; BB536; *B. bifidum*; *B. breve*; *B. adolescentis*; *B. animalis* - штам *B. lactis* BB12), роду *Streptococcus* (*S. thermophilus*), роду *Enterococcus* (*E. faecium* - штам *Enterococcus* SF68), роду *Saccharomyces* (*S. boulardii*) [14,15].

Толерантність пробіотиків як до продукту (проти жорстких умов, таких як рН, титруєма кислотність, токсичність кисню, заморожування, низькі температури або відносно високі температури зберігання), так і до внутрішніх умов живого споживача, залежить від штаму (штамоспецифічна) [16-19].

Біологічні відносини між заквасочними культурами можуть бути у формі синергізму або антагонізму. Оскільки пробіотичні бактерії не здатні адекватно зброджувати молоко і виробляти кисломолочні продукти з задовільними сенсорними властивостями, звичайною практикою є додавання до них традиційних бактерій йогурту (наприклад, *S. thermophilus*), що називається «підтримуючою культурою» або «додатковою культурою». Повільний ріст пробіотичних мікроорганізмів в молоці призводить до ризику надмірного росту небажаних мікроорганізмів, а штами, які погано ростуть, можуть давати неприємні запахи [20]. Час інкубації при виробництві кисломолочних продуктів тільки з пробіотичними культурами повинен збільшуватись до 8-24 годин в порівнянні з традиційними йогуртовими бактеріями з приблизним періодом 3-4 години [21,22].

Отже, одним з найбільш важливих аспектів у ферментованих функціональних продуктах є взаємодія між заквасочними культурами і пробіотичними бактеріями (особливо це може бути враховано в багатьох ферментованих функціональних продуктах, заснованих на молочнокислій ферментації) [23].

Одним з відомих функціональних продуктів, що здатний нормалізувати ліпідний обмін та рівень холестерину у людей похилого є кисломолочний напій – Геролакт. Продукт отриманий на основі бактеріального препарату «Стрептосан» із включенням *Streptococcus thermophilus*, як сильного кислотоутворювача та *Enterococcus faecium*, як функціонального мікроорганізму. Використання останнього пояснюється високою здатністю до виживання, що в свою чергу створює можливості використання їх у різних технологічних процесах. Варто зазначити, що *Enterococcus faecium* проявляє геродіетичні властивості.

Рід *Enterococcus* належить до царства Бактерії підцарства Справжні бактерії. Відповідно до визначника Берджі бактерії відносяться до II категорії Грампозитивні еубактерії, що мають клітинну стінку (Firmacutes);

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		15

17-ї групи Грампозитивні коки; підгрупи 17.2 Факультативно анаеробні види [24].

Рід *Streptococcus* належить до царства Бактерії підцарства Справжні бактерії. Відповідно до визначника Берджі бактерії відносяться до II категорії Грампозитивні еубактерії, що мають клітинну стінку (Firmacutes); 17-ї групи Грампозитивні коки; підгрупи 17.2 Факультативно анаеробні види.

1.2. Морфолого-цитологічні ознаки

Рід *Enterococcus*. Клітини сферичні чи овальні, $0.6-2.0 \times 0.6-2.5$ мкм. Розташовуються парами або у короткі ланцюжки у рідкому середовищі. Ендоспор не утворюють. Грампозитивні. Іноді рухомі за рахунок нечисельник джгутиків. Чітко виражені капсули відсутні.

Рід *Streptococcus*. Клітини сферичної або овальної форми, діаметром $0.5-2.0$ мкм, при рості у рідкому середовищі – парами або у зібрані у ланцюжки, іноді подовжені вздовж вісі ланцюжка (ланцетовидної форми). Нерухомі; спор не утворюють; грампозитивні. У деяких видів клітина оточена капсулою.

1.3. Культуральні ознаки

Enterococcus faecium. Поверхня колонії ентерококів на щільному живильному середовищі має вигляд компактно розташованих клітин овальної форми. В мазках з бульонної культури мають вигляд скупчень або ланцюжків. Характерний поліморфізм, що проявляється в утворенні круглих або витягнутих клітин різних розмірів.

Ентерокок добре росте на всіх звичайних поживних середовищах при 37°C , так само і при кімнатній температурі; на агарі дає прозорі каплеподібні колонії, типові для стрептококової групи, величиною в 1-2 мм (рис.1.3.1) [25]. Можуть давати гамма-гемоліз на кров'яному агарі. У бульйоні ентерокок завжди утворює рівномірну каламуть.

Середовища для культивування: цукровий МПБ, цукровий МПА, кров'яний МПА, сироватковий МПА і сироватковий МПБ. На рідких

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		16

поживних середовищах дають придонний або пристінковий ріст; на кров'яному МПА - дрібні, непігментовані колонії; на 10% ЖСА росту не дають (на відміну від стафілокока).



Рис.1.3.1. Характер росту ентерококів на щільних поживних середовищах [25]

Streptococcus thermophilus. На поверхні щільних середовищ утворює білі, опуклі, гладкі з рівними краями колонії молочного кольору діаметром до 2 мм [26].

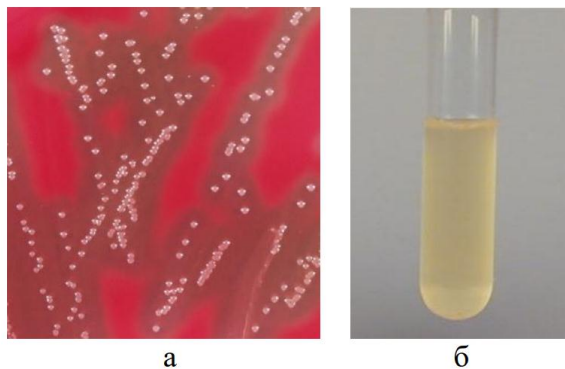


Рис.1.3.2. Характер росту стрептококів на кров'яному агарі (а) і у рідкому поживному середовищі (б) [25].

У МПБ з 2.5% NaCl спостерігається ріст, а з 4% і 6.5% NaCl ріст відсутній; на ентерококовому агарі росте у вигляді блідо-рожевих колоній; ріст на агарі з 0.04% телурита калію відсутній. Росте в гідролізаті молока з рН 9.2, при рН 9.6 росту немає.

Середовища зберігання: МПА, MRS під мінеральним маслом; культура зберігає життєздатність до 3 років при низьких позитивних температурах і до

6 місяців при кімнатній температурі. Середовища культивування: молоко коров'яче цільне нормалізоване або знежирене [27].

1.4. Фізіолого-біохімічні ознаки

Enterococcus faecium. Поживні потреби складні. Факультативні анаероби. Хемоорганогетеротрофи; метаболізм бродильного типу. Зброджують різноманітні вуглеводи з утворенням в основному L(+) молочної кислоти, але не газу, знижуючи кислотність рН до 4,2-4,6. *E. faecium* здатний зброджувати сахарозу, лактозу, трегалозу, гліцерин і маніт, не розкладає сечовину [28]. З органічних джерел азоту можуть бути використані пептон, дріжджовий гідролізат або автолізат. Утворює аміак з аргініну. Гідролізує аргінін. Не володіє ферментом желатиназою. Реакція Фогест-Проскауера позитивна. Піруват, цитрат, малат не використовується як джерело енергії для росту. Утворює кислоту також з L-арабінози, мелібіози, галактози, фруктози, манози, амігдаліна, мальтози. Не утворює кислоту з ксилози, рамнози, рафінози [29]. Каталазонегативні. Зазвичай ростуть при температурних межах 10-45⁰С (оптимальна температура 37⁰С), при рН 9.6, концентрації NaCl 6.5% і жовчі - 40%. В деяких випадках відновлюють нітрати. Зазвичай зброджують лактозу.

Потреба ентерококів у вітамінах численна. За винятком фолату, ліпоєвої кислоти, диметилменахінона і гематина, мало що відомо стосовно цього питання для ентерококів. Більшість потребують біотин, кобаламін, нікотинат, ліпоєву кислоту, пантотенат, рибофлавін і піридоксин [30]. Характерно, що для росту *E. faecium* необхідний фолат. Імовірно вид синтезує тіамін, так як гени ферментів в цьому шляху біосинтезу присутні в базах даних геному [31].

E. faecium також володіє ферментами для початкових стадій катаболізму фруктозаміну, що потенційно дозволяє йому рости на цьому рослинному джерелі вуглецю [32]. Людські ентерококові ізоляти можуть використовувати також пектин in vitro.

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		18

Лактат є основним кінцевим продуктом ферментації в процесі росту у надлишку глюкози у відновлювальних умовах. Гени, які кодують ферменти для окислення лактату, у ентерококів не встановлені.

Ознаками, які відрізняють ентерококів від стрептококів, є їх здатність виживати після 30 хв нагрівання при 60°C, рости в бульйоні, доповненому 40% жовчних солей, і гідролізувати ескулін. Ентерокок розкладає глікозиди (ескулін, саліцин і метил-глікозид), не розчиняється жовчю і стійкий до оптохіну.

Селективність деяких зазвичай використовуваних або цитованих середовищ представлена наступними: Azide dextrose broth (Азидно-глюкозний бульйон), Selective agar Slanetz & Bartley (Селективний агар по Сланецу и Бертлі), Esculin Azide agar (Канаміцин ескулін азид агар). Здатність культури рости на жовчно-лужному агарі і редукувати метиленовий синій в молоці вказує на приналежність мікроорганізму до ентерококів (рис.1.4.1) [33].

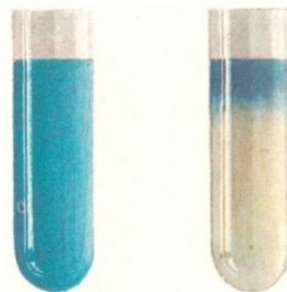


Рис.1.4.1 – Редукція метиленового синього у молоці ентерококами [33].

Умови підтримки і зберігання: щомісячні пересівання на агаризованому середовищі; метод зберігання - ліофілізація в сепарованому молоці.

Стандартний метод визначення ентерококів (в тому числі *E. faecium*) заснований на висіві певної кількості продукту або його розведення в рідкому селективному середовищі або на поверхні щільного селективного

середовища, аеробному культивуванні посівів при $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ протягом 24-48 год, підтвердження приналежності мікроорганізмів, що вирости, до ентерококів, перерахунку їх кількості на 1 г (1 см³) продукту [34].

Варто зазначити, що жодне середовище не є повністю селективним для всіх штамів ентерококів, але деякі середовища є більш селективними для деяких видів ентерококів, зокрема *E. faecium*, що служить індикатором фекального забруднення або спричинює внутрішньолікарняні інфекції [35].

Будова клітин *E. faecium* відповідає грампозитивній бактерії. Грампозитивні клітини мають товстий пептидоглікановий шар разом з тейхоевою та ліпотейхоевою кислотами. Бактерія має кільцеву ДНК, а також кілька плазмід. Здатна кон'югувати за рахунок вивільнення статевих феромонів і секретує агрегаційні речовини, а також утворює біоплівки. Клітина має пілі та джгутики [36].

Відповідно до описаної морфології цих організмів, розмноження відбувається шляхом їх поділу. Після поділу клітини утворюють в залежності від стадії поділу структури, які є типовими для даного виду коків. Зокрема, ентерококи утворюють складені у формі ланцюжка клітини.

Метаболізм *E. faecium* не має циклу Кребса та дихального ланцюга, і тому він отримує енергію за рахунок бродіння. Це факультативний анаероб, що означає, що він може виробляти АТФ за допомогою аеробного дихання, якщо присутній кисень, але буде використовувати ферментацію, якщо кисню немає [37].

E. faecium мають високу ферментативну активність, характеризуються вираженим антагонізмом по відношенню до умовно-патогенних мікробів (виробляють ентероцини). Дегідрування пірувату *E. faecium* може відбуватися в анаеробних умовах за допомогою піруватформіатліази (або форміатацетилтрансферази). Цей фермент перетворює піруват і КоА в форміат і ацетил-КоА за незвичним механізмом проміжного білкового радикала. Супероксиддисмутаза і пероксидази є основними способами

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		20

захисту від каскаду окислювальних пошкоджень, ініційованих O_2^- . Всі штами продукують фермент лейцинамінопептидазу.

E. faecium може володіти високою стійкістю до антибіотиків і набувати відповідну стійкість завдяки плазмідам і кон'югативним транспозонам, а також хромосомним генам, які кодують стійкість. Деякі штами стали стійкими до ванкоміцину, пеніциліну, гентаміцину, тетрацикліну, еритроміцину і тейкопланіну. Ці послідовності можуть поширюватися на інші ізоляти шляхом горизонтального переносу генів і надавати нові механізми специфічності ізолята.

Горизонтальний перенос генів дозволяє здійснювати обмін генетичним матеріалом між бактеріями. Найбільш важливим механізмом є кон'югація, при якій системи секреції типу IV створюють канали між бактеріальними клітинами для перенесення ДНК. При кон'югації можуть бути перенесені з штаму-донора в штам-реципієнт великі фрагменти (до 800 т.п.н.) хромосомної ДНК.

Іншими механізмами є трансформація, при якій бактерії здатні поглинати оголену ДНК, розташовану в їх безпосередньому оточенні, і трансдукція, при якій ДНК захоплюється всередині бактеріофагів, які інфікували бактеріальну клітину, а потім вивільняється і вставляється в геном нової клітини після передачі бактеріофага. Інші механізми перенесення генів, такі як нанотрубки, мікровезикули і агенти переносу генів, ще не були описані у ентерококів [38].

Аналіз ентерококів виявив величезну пластичність їх геному. У *E. faecium* придбані елементи можуть становити до 25% генома [39,40].

Перенесення генетичної інформації залежить від присутності плазмід, чутливих до феромону. Перенесення плазмідної ДНК у хромосому може протікати шляхом рекомбінації між гомологічними послідовностями плазмиди і хромосоми [41].

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		21

Плазмідам відводиться ключова роль у поширенні і персистенції детермінант стійкості у ентерококів. Крім того, плазміди мають здатність забезпечувати власну реплікацію і успадкування [42].

Плазміди можуть виступати в якості засобів передачі генів вірулентності і стійкості до протимікробних препаратів [43]. Кілька механізмів опосередкованої плазмідами стійкості були описані в *E. faecium* [44,45], включаючи стійкість до глікопептидів, викликану присутністю кластерів генів *vanA* і *vanB* (Tn1546 і Tn1549, відповідно), стійкість до аміноглікозидів, викликана присутністю *aac(6')* - ген *Ie-aph (2'')* (Tn5281), стійкість до тетрацикліну, опосередкована *tet(M)*, стійкість до лінезоліду внаслідок присутності *cfr*, *cfr(B)*, *optrA* і *poxtA*.

Наразі всі охарактеризовані ентерококові фаги належать до сімейств *Podoviridae*, *Siphoviridae* або *Myoviridae*. Порівняльний геномний аналіз фагів *E. faecium* до теперішнього часу не проводився, і, отже, їх потенційний внесок в патогенез невідомий. Трансдукція ентерококів, зокрема міжвидова трансдукція має велике значення, оскільки вона розширює коло реципієнтів, що беруть участь в передачі стійкості до протимікробних препаратів [46].

Помірні фаги, виділені з *E. faecium*, морфологічно ідентичні профагам з *E. faecalis*. Вони мають ізометричну головку розміром близько 40 нм і довжиною нескоротливий хвіст від 70 до 220 нм [47].

Відомо, що помірні бактеріофаги є важливими факторами пластичності геному у видів *E. faecium*. Досліджені геноми профага мають розмір від 13,9 до 55,1 кб, із середнім вмістом G+C від 35 до 37,9% і демонструють значні варіації кодування від 17 до 72 відкритих рамок зчитування, більшість з яких організовані так, що вони транскрибуються в одному напрямку, тоді як модуль лізогенії зазвичай транскрибується в протилежному напрямку.

В результаті порівняльного геномного аналізу профагів *E. faecium*, вилучених на підставі того, що їх послідовності містили гени як інтегрази, так і лізину, профаги були розділені на вісім різних типів послідовностей від А до Н. Більшість профагів в групах А і С відносяться до коменсалів і

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		22

ізолятів тварин. Послідовності кластерів В і D це змішані кластери, які містять профаги, виділені з клінічних, коменсальних тварин і річкових джерел води, в той час як більшість з кластерів F присутні в клінічних ізолятах. Дерево кладограма (рис. 1.4.2) показує, що між виявленими кластерами генома профага існують чіткі зв'язки [48].

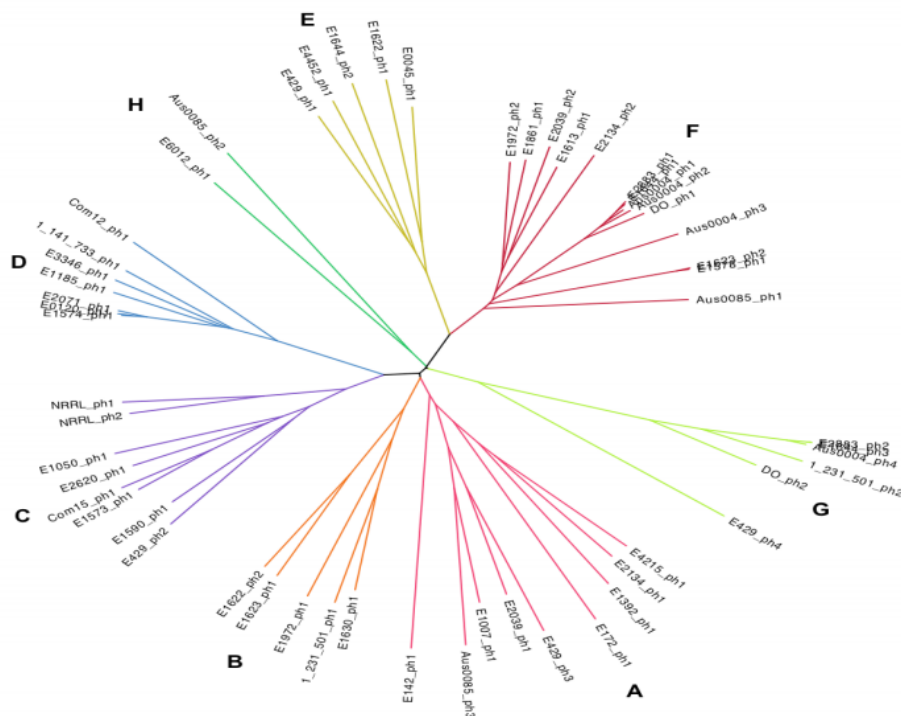


Рис. 1.4.2. Дерево кладограми профага *E. faecium* [48].

Streptococcus thermophilus. На відміну від інших молочнокислих бактерій, єдиним середовищем, з якого було виділено *S. thermophilus*, є молоко [49]. Відповідно до цієї обмеженої екологічної ніші, лактоза, а не глюкоза, є кращим джерелом вуглецю для *S. thermophilus* [50]. Здатність зброджувати лактозу, основний цукор молока, в молочну кислоту має важливе значення для росту і залежить від лактозопермеази нефосфотрансферазної системи (LacS) і бета-галактозидази (LacZ). *S. thermophilus* задовольняє свої потреби в амінокислотах під час росту в молоці і проявляє лише деяку ауксотрофність по амінокислотам в порівнянні з моделлю молочнокислої бактерії *L. lactis* [51]. Присутність пов'язаної з

клітинною стінкою протеїнази є винятковою серед штамів *S. thermophilus* [52].

Було виявлено, що *S. thermophilus* споживає велику кількість лейцину, глютамінової кислоти, лізину, аланіну, аргініну і аспарагіну в середовищі M17 [53].

Лактоза забезпечує енергією і джерелом вуглецю *S. thermophilus* і демонструє найвище споживання в лаг-фазі. Основна роль лактози може полягати в забезпеченні енергії для регуляції внутрішньоклітинних фізіологічних станів в лаг-фазі. *S. thermophilus* використовує унікальний симпорт, названий транспортером лактози LacS, який використовує протонний градієнт для колокації галактозиду всередині клітини. Накопичення галактози сприяє протонейтральному обміну лактози на галактозу. Лактоза потім метаболізується і використовується для виробництва енергії.

Вітаміни є необхідними мікроелементами для *S. thermophilus*, в першу чергу це рибофлавін, нікотинова кислота і пантотенат кальцію, які сприяють росту бактерій [54]. Крім того, деякі вітаміни можуть заміняти один одного, а окремим штамам для нормального росту потрібно від одного до чотирьох вітамінів [55].

Відомо, що Mg^{2+} і Ca^{2+} стимулюють ріст і покращують виживаність *S. thermophilus*. Активність кислої фосфатази може бути збільшена як Ca^{2+} , так і Mg^{2+} , особливо Ca^{2+} [56]. Активність кислої фосфатази і β -глюкозидази інгібується Fe^{2+} і Zn^{2+} [57]. Видалення Fe^{2+} і Zn^{2+} з поживного середовища не впливає на ріст *S. thermophilus*. Через негативний вплив цих іонів, а також низьку кількість і співвідношення їх споживання, їх слід зменшувати або виключати з поживних середовищ. Виявлено, що присутність неорганічного фосфату в формі дикалійфосфата в MRS помітно знижує активність фосфатаз [58]. Таким чином, концентрації фосфату в середовищах мають бути невеликими або замінені органічним фосфором.

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		24

Ріст молочнокислих бактерій обмежений через низький вміст амінокислот в молоці. Молоко містить безліч білків. Отже, штами повинні використовувати білки, продукувати пептиди і амінокислоти, щоб задовольнити потребу в джерелі азоту під час швидкого зростання в молоці. Система гідролізу білка забезпечує основні амінокислоти для росту клітин, а також впливає на сенсорні характеристики і смак кисломолочних продуктів [59].

Протеолітична система молочнокислих бактерій в основному складається з: а) протеази, здатної до гідролізу казеїну; б) набору амінокислотних і пептидних транспортних систем, необхідних для імпорту амінокислот, і в) набору внутрішньоклітинних пептидаз, що беруть участь в гідролізі похідних казеїну, необхідних для різних процесів домашнього господарства, переносників пептидів і внутрішньоклітинних пептидаз.

Протеолітична система *S. thermophilus* включає більше 20 протеолітичних ферментів, включаючи протеїназу, пов'язану з клітинною стінкою PrtS, ендопептидази (PepO, PepF), дипептидази (PepD, PepV), трипептидазу PeoT і пролінпептидази (PepX, PeoP, PepQ) і ін..

S. thermophilus містить дві унікальні пептидази, олігопептидазу і амінопептидазу PepS, які виконують кілька функцій при рості бактерій. Амінопептидази представляють собою унікальні ферменти, які функціонують як екзопептидази, ферменти, які каталізують відщеплення певних амінокислот від кінця поліпептиду. Ці важливі ферменти виконують безліч різних функцій, включаючи проліферацію клітин: дозрівання білків, гідроліз регуляторних білків, регуляцію експресії генів, метаболізм азоту і ін.. Амінопептидаза PepS є одновимірним металопептидом, що володіє високою афіністю до пептидів з аргініном або ароматичними амінокислотами на N-кінці пептиду.

Харчова промисловість використовує здатність бактерії гідролізувати молочні білки, казеїн, в сполуки азоту. Ферменти *S. thermophilus*, такі як амінопептидаза, використовуються для ферментації їжі. Екзополісахариди,

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		25

створені цими пептидазами, необхідні для створення текстури кисломолочних продуктів і органолептичних властивостей молочних продуктів [60]. Здатність до підкислення, протеолітична активність, продукування екзополісахаридів і здатність продукувати ароматичні речовини є ключовими виробничими характеристиками штамів.

S. thermophilus здатний генерувати енергію в формі АТФ за допомогою аеробного дихання з присутністю кисню; однак, без присутності кисню, він все ще може виробляти АТФ шляхом ферментації. У *S. thermophilus* відсутні ферменти цитохроми, оксидаза і каталаза.

Агар *S. thermophilus* (ST) і M17 рекомендуються для селективного підрахунку *S. thermophilus*. На середовищі M17 термофільні стрептококи утворюють сочевицеподібні колонії діаметром 1-2 мм [61].

Було виявлено, що агар *Streptococcus thermophilus* придатний для селективного підрахунку *S. thermophilus* при аеробній інкубації при 37°C протягом 24 годин.

Streptococcus thermophilus є факультативними анаеробами. Хемоорганотрофи; для росту потребують багатих поживних середовищ і іноді в 5% CO₂. Метаболізм бродильного типу; утворюють в основному лактат, але не газ. Каталазонегативні. Діапазон температури для росту 25-45°C (оптимум 37°C). Згортають молоко при 50°C; межа кислотоутворення - 100-115°T; диференціальні ознаки - не розвиваються при наявності в молоці 0,1% метиленового блакитного, не дають росту в поживних середовищах з рН 9,6 і з вмістом 6,5% NaCl [62].

Більшість штамів *S. thermophilus* можуть синтезувати екзополісахариди [63]. Крім того, деякі штами *S. thermophilus* можуть продукувати капсульні полісахариди [64].

Продукування екзополісахаридів (ЕПС) є одним з найважливіших властивостей *S. thermophilus*, особливо молочних штамів. ЕПС діють як природні біологічні згущувачі, вироблені in situ, які можуть покращувати в'язкість, текстуру і смак молочних продуктів і запобігати синерезису в

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		26

йогурті [65]. ЕПС з *S. thermophilus* корисні для здоров'я тварин-господарів і підсилюють імунні реакції тварин-господарів [66]. Передбачається, що імунорегуляторні ефекти ЕРС пов'язані з їх хімічним складом.

ЕПС представляють собою довголанцюгові полісахариди, що складаються з розгалужених, повторюваних ланок цукрів або похідних цукру. Більшість штамів *S. thermophilus* синтезують гетерополісахариди. ЕПС *S. thermophilus* переважно складаються з галактози, глюкози і рамнози в різних співвідношеннях. Крім того, ацетилгалактозамінова, фукозна та ацетильована галактозна складові були також виявлені в ЕПС *S. thermophilus* [67]. Як правило, структури ЕПС мають тісний зв'язок з їх функціями. Отже, високополіморфні структури ЕПС можуть мати широкий потенціал застосування [68].

Стрептококи розмножуються шляхом поділу надвоє, причому дочірні клітини зберігають зв'язок один з одним, формуючи ланцюжка, що містять від двох до кількох сотень мікроорганізмів. Таке розташування обумовлено поділом клітин в одній площині (рисунк 1.4.3).

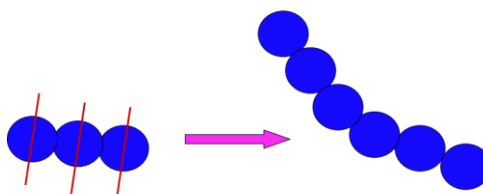


Рис. 1.4.3. - Розташування клітин при поділі стрептококів [68].

Хоча *S. thermophilus* тісно пов'язаний з іншими патогенними стрептококами (такими як *S. pneumoniae* і *S. pyogenes*), *S. thermophilus* класифікується як непатогенний альфа-гемолітичний вид, що входить до групи viridians стрептококів.

Клітинна стінка *Streptococcus thermophilus* складається з N-ацетилглюкозаміну і N-ацетилмурамової кислоти, яка пов'язана ефірними зв'язками. Ця структура дозволяє *S. thermophilus* витримувати підвищені

температури. *S. thermophilus* не містить генів або містить псевдогени, які експресують поверхневий білок (виключаючи ліпопротеїни); патогенні стрептококи використовують ці поверхневі білки, щоб прилипати до поверхонь слизової оболонки і обходити захисні механізми господаря.

Як молекула ДНК із здатністю до самореплікації, плазмід не мають необхідного генетичного матеріалу для виживання бактерій, але вони часто несуть деякі особливі гени, які надають важливі ознаки штамів, наприклад, використання казеїну, біосинтез екзополісахаридів, транспорт калію, стійкість до бактеріофагів, гени, пов'язані з виробництвом бактеріоцинів тощо [69]. У порівнянні з деякими молочнокислими бактеріями, які містять велику кількість плазмід, штами *S. thermophilus* мають дуже мало плазмід. Деякі з них винесені у таблицю 1.4.1.[70].

Таблиця 1.4.1. Плазмід *Streptococcus thermophiles* [70].

Назва плазмід	Штам	Копіювання	Розмір (кб)	(G+C) %	Rep-білок	Функція	Джерело
pSTER_A	PMP-9	RCR	4,45	37		ДНК-сегрегація АТФази FtsK/SpoIIIE чи спорідненого білку	Йогурт
pSTER_B	PMP-9	RCR	3,36	35,1	Rep 314 aa	Малий білок теплового шоку	Йогурт
pSt0	St0	RCR	8,1	37		Цитозин-специфічна метилтрансфераза; рестрикційна ендонуклеаза II типу	Кисломо-лочний продукт
pER35	ST135	RCR	9,53	36,5	RepA 315 aa	Невеликий білок теплового шоку; блок обмежень типу IC; модифікація субодиниці типу IC	

Більшість штамів *S. thermophilus* не містять плазмід. Деякі штами мають не більше 2 плазмід розміром від 2,67 до 8,14 т.п.н. На сьогоднішній

день більшість плазмід *S. thermophilus* не мають явних фенотипових ознак. Деякі плазміди кодують невеликі білки теплового шоку. Деякі дослідження показують, що невеликі білки теплового шоку індукуються підвищеними температурами і низьким рН, і експресія цих білків може збільшити життєздатність бактерій в екстремальних умовах [71].

Виходячи з даних досліджень оцінки чутливості ізолятів *Streptococcus thermophilus* до еритроміцину, кліндаміцину, стрептоміцину, гентаміцину, тетрацикліну і ампіциліну [72] більшість штамів чутливі до всіх протестованих антибіотиків, в той час як було виявлено кілька штамів, стійких до еритроміцину, тетрацикліну і стрептоміцину. Таким чином, можна стверджувати, що *S. thermophilus* характеризується високою чутливістю до антибіотиків (таблиця 1.4.2) [73].

Таблиця 1.4.2. Активність антибіотиків щодо промислових штамів *S.thermophilus* in vitro [73]

Антибіотик	Мінімальна інгібуюча концентрація, мкг/см ³
	<i>Streptococcus thermophilus</i>
Ампіцилін	0,01-0,02
Бензилпеніцилін	0,02-0,50
Еритроміцин	0,05-0,10
Тетрациклін	0,20-0,50
Хлорамфенікол	0,50-1,00
Стрептоміцин	0,50-1,00

Протягом декількох десятиліть повідомлення про зараження фагом *S. thermophilus* були обмежені двома групами, названими *cos* і *pac*. Вони були визначені як окремі групи на основі їх способів упаковки і кількості основних структурних білків [74]. Фаги групи *cos* це строго вірулентні фаги, які мають ізометричні капсиди і не скорочувальні хвости завдовжки не менше 200 нм [75]. Навпаки, група *pac*-фагів включає в себе як вірулентних, так і помірних членів, хоча частота лізогенезу у *S. thermophilus*, як повідомляється, досить низька - менше 10% [76]. Морфологічно *pac*- фаги нагадують *cos*-фаги з довгими не скорочувальними хвостами і ізометричними

капсидами. У 2011 і 2016 роках дві нові групи фагів *S. thermophilus*, тобто групи 5093 і 987, були ідентифіковані відповідно. Їх геноми, мабуть, придбали генетичний матеріал від профагів немолочних стрептококів в разі 5093-фагів [77] і від молочнокислих бактерій *Lactococcus lactis* у випадку 987 фагів [78]. Морфологія фагів 5093 і 987 відрізняється від морфології *cos* і *pac* (рис. 1.4.4.) [79], так як 5093 фаги мають глобулярні придатки, прикріплені до їх кінчиків хвоста, тоді як 987 фаги мають значно коротші хвости, ніж інші фаги групи, з широким придатком на кінчику хвоста, який нагадує так звану «опорну плиту» лактококових фагів P335 [80].

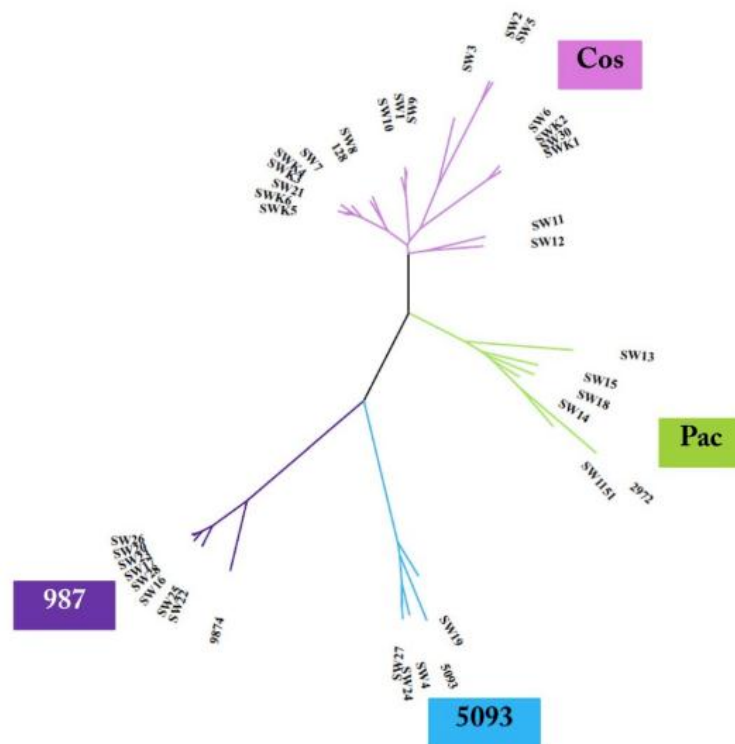


Рис. 1.4.4. Філогенетичне дерево фагових ізолятів. Включає представників кожної з чотирьох описаних фагових груп. *cos*-фаги демонструють найбільшу генетичну різноманітність, в той час як групи 987 і 5093 демонструють високу ступінь збереження геному незалежно від географічного фону [79].

1.5. Серологічні ознаки

Говорячи про механізми імуномодуляції пробіотичних мікроорганізмів, можна узагальнити дві виконувані ними функції, які полягають передусім в участі у обмінних процесах макроорганізму та його захисті від можливих інфекційних агентів, що можуть потрапити зовні [81]. Тобто механізм їхньої дії є більш опосередкованим і комплексним, а тому представлення профілактичного чи лікувального ефектів мікроорганізмів у вигляді взаємодії антиген-антитіло не відображає усього біотерапевтичного потенціалу молочнокислих бактерій.

Streptococcus thermophilus використовується з урахуванням його здатності до синтезу лактази, ферменту, який перетворює лактозу (молочний цукор) в простий цукор, який допомагає людям, які не переносять лактозу, перетравлювати молоко і молочні продукти. Таким чином, споживання пробіотику полегшує симптоми непереносимості лактози та інших шлунково-кишкових проблем. Разом з тим основним метаболічним ефектом молочної кислоти є регулювання активності кишечника, закислення та підвищення осмолярності кишкового вмісту, стимулювання перильстатики. На додаток, *S. thermophilus* також синтезує безліч антагоністичних факторів, які включають антибіотикоподібні речовини і бактерицидні білки, названі бактеріюцинами, які допомагають запобігти кілька типів інфекцій від різних патогенних мікроорганізмів [82].

Експерименти *in vitro* на моделі гнотобіонтів демонструють, що лактат, що продукується *S. thermophilus*, може, частково підтримувати стимуляцію KLF4, що бере участь в диференціюванні секреторних клітин [83].

Ентероцини, які продукує *Enterococcus faecium*, являють собою невеликі антимікробні пептиди, які, як відомо, мають широкий спектр інгібуючої активності відносно бактерій, що викликають псування, і харчових патогенів [84].

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		31

Важливим буде також згадати найбільш поширені і добре описані детермінанти вірулентності, якими є агрегаційні речовини (*agg*, *asa1*), цитолізін (*cyl*), желатинази (*gelE*), позаклітинний поверхневий білок (*esp*), адгезія до колагену (*ace*, *act*) і адгезивний ендокардитний антигени (*efaAfs* і *efaAfm*) [85].

Інші детермінанти вірулентності, які також пов'язані з ентерококковими інфекціями менш ідентифіковані і недостатньо добре описані. У число цих факторів вірулентності входить ген *sag* *E. faecium*, здатний зв'язуватися з широким спектром білків позаклітинного матриксу [86]. Інший механізм адгезії *E. faecium*, пов'язаний із геном *scm*, забезпечує ефективне зв'язування з колагеном типу IV [87].

Більш детальна інформація стосовно механізмів впливу пробіотичних молочнокислих бактерій цільового препарату на біохімічні процеси макроорганізму наводиться у наступних розділах роботи.

1.6. Поширення в природі

Enterococcus faecium. Ентерококи є відносно стійкими організмами та зустрічаються в широкому діапазоні екологічних ніш, таких як ґрунт, вода, рослини і шлунково-кишковий тракт теплокровних тварин. Вони також зустрічаються досить часто у великих кількостях (до 10^7 КУО/г) у багатьох продуктах, зокрема, ферментованих продуктах, таких як середземноморські сири і ферментоване м'ясо; вони використовуються в якості пробіотиків у людей і тварин [88].

Enterococcus faecium є частиною нормальної кишкової флори у людей і зазвичай не викликає ніяких патологічних симптомів; є опортуністичним патогеном і може викликати бактеріємію, ендокардит, рани в черевній порожнині і сечовивідних шляхах, а також інші інфекції [89].

Enterococcus faecium входить до складу мікрофлори ротової порожнини, кишечника та сечостатевої системи. *E. faecium* виділяється при дослідженнях мікрофлори піхви 25,3% здорових жінок [90]. Більшість

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		32

інфекцій, що викликаються ентерококами, носить ендогенний характер і обумовлено інвазією мікроорганізмів при надмірній колонізації даними бактеріями сайтів прикріплення. Дослідженнями показана можливість виникнення нозокоміальної інфекції, особливо при високій частоті застосування цефалоспоринов широкого спектру дії [91,92]. Їх присутність у кишечнику людей і тварин призвела до ролі індикаторів фекального забруднення у воді.

Streptococcus thermophilus - єдиний вид свого роду, який широко використовується в якості закваски в молочній промисловості і має статус «в цілому вважається безпечним» (Generally Regarded As Safe – GRAS) [93]. Відноситься до групи *salivarius* Viridians стрептококів [94], в яку входять два інших виду, *Streptococcus salivarius* і *Streptococcus vestibularis*. Ці два види є коменсальними бактеріями кишечника людини, в той час як екологічна ніша *S. thermophilus* не була ідентифікована [95].

Streptococcus thermophilus росте мимовільно в традиційних молочних продуктах і, як вважають, зберігається у фермерському середовищі [96-98].

Багатолокусна типізація послідовностей і порівняльний геномний аналіз показали, що в популяції *S. thermophilus* мало поліморфізму, і що цей вид демонструє істотну алельну розбіжність з двома іншими видами слинної групи [99]. *S. thermophilus* - клональний вид, який з'явився лише недавно в еволюційному масштабі часу (3000-30 000 років тому) у коменсального предка групи *salivarius* [100]. Його адаптація до вузької і чітко визначеної ніші (молока) сформувала його геном за допомогою втрати функції і горизонтального перенесення генів. Приблизно 10% відкритих рамок зчитування *S. thermophilus* є псевдогенами, їх первинні функції не потрібні для росту в молоці. Багато з цих псевдогенів кодують білки, які беруть участь у метаболізмі вуглеводів, і ця функція є не дуже корисною в молоці, яке містить мало джерел вуглецю [101,102]. Коменсальні і патогенні стрептококи демонструють численні білки на своїй поверхні, багато з яких мають функції, пов'язані з вірулентністю. *S. thermophilus* втратив майже всі ці функції, що

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		33

дозволяє припустити, що для підтримки таких функцій може знадобитися прямий контакт з господарем. Горизонтальне перенесення генів внесло істотний внесок у пластичність генома, еволюцію популяції і адаптацію цього виду до середовища молока. Отримані області генома включають області, які кодують важливі в промисловому відношенні фенотипічні ознаки, такі як продукція бактеріоцинів, лантибіотиків і екзополісахаридів, системи рестрикції-модифікації, толерантність до кисню, метаболізм амінокислот і деградація молочного білка [103].

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
						34
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1. Характеристика кінцевого продукту. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в результаті реалізації технології

Кінцевим продуктом реалізованої технології є суха біомаса асоціації біологічних агентів *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophiles* та *Enterococcus faecium*.

Значимість заквасок підкреслюється тим, що в них нормується кількість клітин молочнокислих бактерій. Так, в концентрованих сухих заквасках кількість клітин має становити не менше $N \cdot 10^{10}$ КУО /г або (10^{10} - 10^{12}) КУО/г [104].

Бактеріальну закваску «Стрептосан» можна класифікувати наступним чином. В залежності від:

- фізичного стану і способу виробництва: сухі - культури заквасочних мікроорганізмів, при виготовленні яких використовується операція ліофільної або розпилювальної або іншої сушки;
- числа мікроорганізмів, що входять до складу: полівидові - закваска, яка складається з двох чи більше видів (підвидів) мікроорганізмів.
- кількості штамів кожного виду, що входять до складу: багатоштамові - закваска, яка складається з декількох штамів певного виду (підвиду) заквасочних мікроорганізмів.
- температурних інтервалів розвитку видів, що входять до складу: - мезофільно-термофільні - закваска, яка включає в себе як мезофільні, так і термофільні заквасочні культури.

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Іванова А.О.			РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	35	129
Керівник		Жолнер Л.Г.						
Затвер.						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

2.2. Схема хімічних перетворень

У процесах промислової ферментації швидкість підкислення молока видами *S. thermophilus* має велике технологічне значення. Швидкість підкислення штамів залежить від їх здатності утилізувати цукор. Ряд робіт вказує на те, що використання глюкози, лактози і фруктози *S. thermophilus* є загальною характеристикою у всіх існуючих дослідженнях, в той час як використання галактози, манози, сахарози, мальтози, мелібіози і рафінози має змінний профіль [105]. Детальний опис метаболізму цукрів і шляхів біосинтезу ЕПС та лактату на прикладі штаму *S. thermophilus* ASCC 1275 представлено на рис.2.2.1.[106].

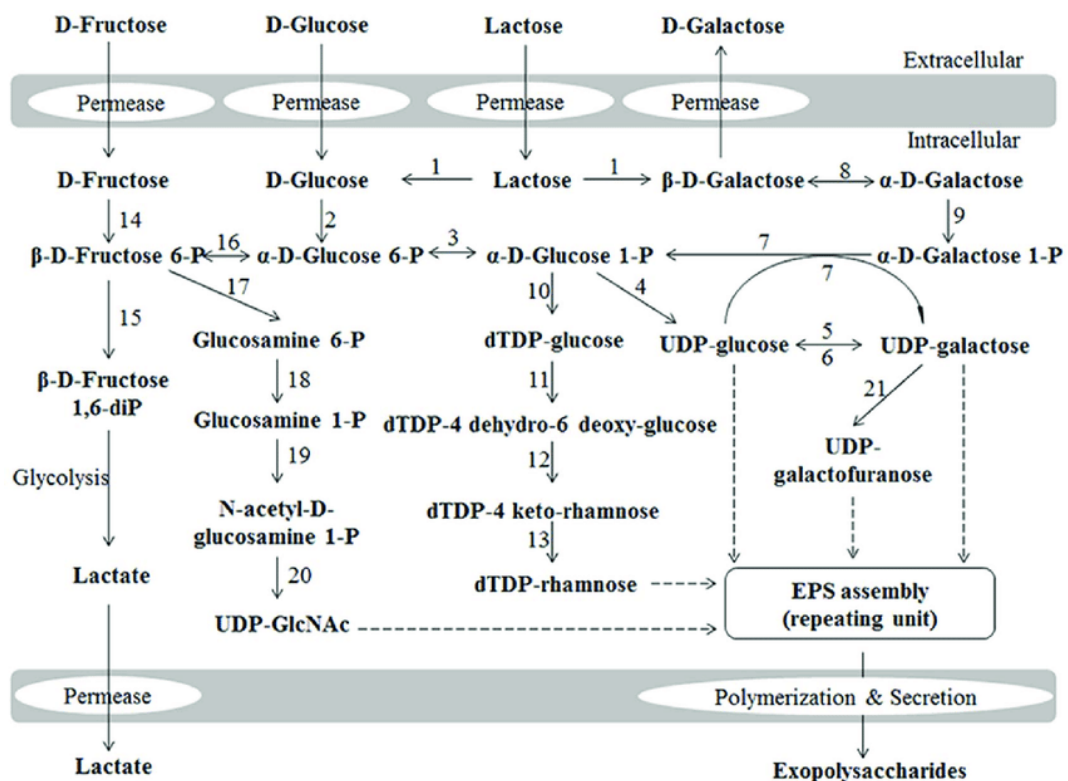


Рис.2.2.1. Біосинтез цукрових нуклеотидів для продукування ЕПС і лактату *S. thermophilus* ASCC 1275 [106].

Цифри відповідають наступним ферментам: 1- β -галактозидаза; 2- глюкокіназа; 3- фосфоглюкомутаза; 4- УДФ-глюкозопірофосфорилаза; 5- УДФ-глюкозо-4-епімераза; 6-УДФ-галактозо-4-епімераза; 7 - галактозо-1-фосфатуридилілтрансфераза; 8-галактозо мутаза; 9-галактокіназа; 10-dTDP-

глюкозопірофосфорилаза; 11-dTDP-глюкозо-4,6-дегідратаза; 12-dTDP-4-кето-6-дезоксиглюкозо-3,5-епімераза; 13-dTDP-4-кето-L-рамнозоредуктаза; 14-фруктокіназа; 15-6-фосфофруктокіназа; 16-фосфоглюкозоізомераза; 17-глутамін-фруктозо-6-фосфаттрансаміназа; 18 - фосфоглюкозаміномутаза; 19 і 20- N-ацетилглюкозамін-1-фосфат-уридилтрансфераза (біфункціональна); 21-УДФ-галактопіранозна мутаза.

Основні виробничі показники *S. thermophilus* наприклад, синтез позаклітинного полісахариду, протеолітичних ферментів і смакових речовин, а також здатність до підкислення і ін. мають неабиякий вплив на якість молочних продуктів. Останній показник штамів визначає терміни виготовлення і якість молочних продуктів. Виробництво позаклітинного полісахариду корисно для поліпшення текстури молочних продуктів. Смакові речовини підвищують прийнятність молочних продуктів. Протеолітична активність штаму впливає не тільки на поглинання джерела азоту, але і на формування смакових речовин. Різні штами мають очевидні відмінності в виробничих характеристиках завдяки довгій еволюції і адаптації до навколишнього середовища.

На здатність біосинтезу ЕПС *S.thermophilus* впливають два фактори: штамозалежні і умови культивування, такі як температура, джерела вуглецю, джерела азоту, рН і т.д. Як правило, кількість ЕПС, що виділяється *S. thermophilus*, знаходиться на відносно низьких рівнях, тобто від 50 до 400 мг/л у молочному середовищі. Наприклад, вихід ЕПС *S. thermophilus* 05-34 досягає 250 мг/л у 10% відновленому знежиреному молоці з 80 г/л сахарози і 30 г/л соєвого пептона при початкових значеннях рН 7,0 і 37 °С протягом 30 год [107].

Як для *E.faecium* так і для *S. thermophilus* оптимальними умовами для росту визначено температуру 37 °С . Максимальна питома швидкість росту спостерігається в діапазоні рН від 6,0 до рН 8,0 з оптимумом рН 6,5-6,7. Нижня межа рН, за якої не спостерігається росту 4.5, верхні – 9.8 [108].

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		37

Максимальне підкислення *S. thermophilus* досягається при значеннях рН і температурах, що перевищують оптимальні умови росту [109].

2.3. Методи очистки цільового продукту

Характеристика готового продукту обумовлює відділення біомаси біологічних агентів, що в свою чергу потребує процесів фракціонування культуральної рідини, яка представляє собою багатофазну систему і включає: квазітверду фазу – клітини біологічних агентів, рідку – поживне середовище із метаболітами, газоподібну – розчинений кисень, двоокис вуглецю тощо. Поділ неоднорідних дисперсних систем здійснюють з метою очищення, розділення на фракції, підвищення гомогенності і однорідності фази, тобто обрана технологія має сприяти забезпеченню якості кінцевого готового продукту шляхом реалізації показників якості на кожній стадії.

Вміст біомаси (по сухій речовині) в культуральній рідині зазвичай не перевищує 3 – 4%. Концентрування і отримання товарної форми продукту з культуральної рідини або твердофазної культури здійснюють при подальшій її переробці в залежності від вимог до готового продукту та його специфічних властивостей [110].

Однією з товарних форм випуску продуктів мікробного синтезу є зневоднена мікробна біомаса – сухий напівпродукт. Для часткового зневоднення мікробної біомаси і отримання технічних або очищених продуктів біосинтезу використовують різні способи концентрування: флотацію, сепарацію, фільтрацію, екстракцію іонний обмін, адсорбцію, кристалізацію, мембранні способи і ін. Як правило, технологія виділення і очищення товарного продукту включає декілька стадій виділення і очищення.

Розглядаючи виробництво заквасочних культур, одним із центральних етапів є відділення клітин від ферментаційного середовища. Поставлена задача зазвичай досягається за допомогою дискових центрифуг [111]. Основна перевага центрифугування в порівнянні з іншими методами

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		38

розділення неоднорідних систем – збільшення продуктивності та ефективності розділення. Створювані в роторі відцентрові сили інерції в тисячі і навіть в десятки тисяч разів можуть перевищувати гравітаційні сили.

У практиці центрифугування $\omega^2 r \gg g$, тому гравітаційною силою можна практично знехтувати і характеризувати напруженість відцентрового силового поля (силу, що діє на одиницю маси) величиною $\omega^2 r$. Таким чином, при центрифугуванні прискорення твердої частинки, яка осаджується, в порівнянні з гравітаційним збільшується на величину $\omega^2 r / g = \Phi$, яка називається фактором розділення. Так як кутова швидкість $\omega = \omega r$, то $\Phi = \omega^2 r / g = \omega / g r = Fr_v$, де Fr_v – відцентровий критерій Фруда [112]. Залежно від фактора розділення центрифуги діляться на звичайні ($\Phi < 35000$) та надцентрифуги ($\Phi > 35000$). Якщо $\Phi \approx 12000$, то центрифуги мають ротор з трубчатим або тарільчастим барабаном. Останні називають сепараторами. В мікробіологічній промисловості сепаратори є одними з розповсюджених типів центрифуг.

Швидкість осадження часточок сепараторі (м/с):

$$v_c = \frac{d^2 \cdot \omega^2 \cdot R \cdot (\rho_t - \rho_p)}{18 \cdot \mu \cdot 900},$$

де d - діаметр твердих частинок, м; ω - частота обертів барабана, хв^{-1} ; R - радіус барабана, м; ρ_t - густина твердої фази, кг/см^3 ; ρ_p - густина рідкої фази, кг/м^3 ; μ - динамічна в'язкість, $\text{Па} \cdot \text{с}$ [113].

Враховуючи вихідні дані проектування, зокрема розміри нашої асоціації біологічних агентів, які не перевищують 2,5 мкм, пропонується використання бактофуги для фракціонування фаз. Фактор розділення на бактофузі дорівнює 142000, діаметр частинок, що відділяють, $5 \cdot 10^{-4}$ мм, що є задовільним для реалізації поставленої задачі.

2.4. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Заквасочні культури відіграють важливу роль у виробництві кисломолочних продуктів через їх метаболізм і, отже, розвиток текстури і

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		39

смаку. Однією з цілей використання заквасочних культур є прискорення виробництва молочної кислоти при ферментації цукрів. Метаболізм вуглеводів стартовою культурою молочнокислих бактерій можна широко класифікувати як гомоферментація або гетероферментація. Гомоферментативні молочнокислі бактерії, яким є термофільний стрептокок генерують D- або DL - ізомери молочної кислоти [114]. Виробництво молочної кислоти разом з її буферною здатністю визначає кінцевий рН продукту і, таким чином, впливає на мікрофлору і ферментативні реакції, відповідальні за смак. Антимікробні властивості молочної кислоти обумовлені створенням несприятливих умов, які знижують швидкість росту небажаних мікроорганізмів [115].

Використання заквасок, зокрема молочнокислих бактерій, як конкурентної мікробіоти в ферментованих продуктах може грати подвійну роль в придушенні або контролі росту харчових патогенів або мікроорганізмів, що викликають псування харчових продуктів, з подальшим збільшенням терміну придатності при збереженні сенсорних властивостей продукти, а саме колір, смак, текстура і харчова цінність [116]. Стартові культури беруть участь в конкурентному виключенні, перевершуючи мікроорганізми псування за поживними речовинами і киснем [117].

Молочнокислі бактерії можуть чинити біозахисну дію проти інших мікроорганізмів, пригнічуючи або контролюючи їх ріст, або конкуруючи за поживні речовини і /або продукуючи бактеріоцини або інші антагоністичні сполуки, такі як органічні кислоти, перекис водню або ферменти [118].

Варто також зазначити, що використання пробіотичної закваски «Стрептосан» лежить в основі технології виробництва кисломолочного продукту «Геролакт». Вживання цього напою позитивно впливає на мікрофлору кишечника і, в цілому на роботу шлунково-кишкового тракту, нормалізує обмін речовин в організмі. Результати досліджень показують, що регулярне вживання «Геролакту» допомагає відновити корисну мікрофлору кишечника і знизити рівень холестерину в крові [119].

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		40

Селекціонований штам *Enterococcus faecium*, що увійшов до складу заквашувальної композиції, характеризується антагонізмом по відношенню до патогенних та умовно-патогенних бактерій. Під час клінічних досліджень було встановлено, що при споживанні продукту у дослідних пацієнтів в дистальному відрізку кишківника відзначалося збільшення молочнокислої мікрофлори в багато разів, зниження гнилісної, відсутність патогенної та умовно-патогенної флори. За результатами серії клінічних рандомізованих досліджень продукту (виробленого у Данії під назвою “Gaio”), було отримано статистично достовірне підтвердження зменшення величини загального холестерину та холестерину низької щільності у пацієнтів, які вживали цей кисломолочний продукт [120].

Важливим буде зауважити, що механізми, за допомогою яких пробіотики можуть впливати на фізіологію господаря, до сих пір не повністю вивчені. Мікробна ендокринологія, що представляє собою союз мікробіології, ендокринології та нейробіології, висунула теорію про те, що мікроорганізми здатні служити нейрохімічним засобом доставки [121]. Таким чином нейрохімічні речовини можуть служити спільною ланкою між господарем і бактерією, забезпечуючи двонаправлений контакт. Повідомляється, що *Enterococcus* sp. має здатність продукувати дофамін в шлунково-кишковому середовищі, коли він поставляється з попередником дофаміну L-3,4-дигідроксифенілаланіном. Відповідно до цього припускають можливість того, що пробіотики, що містять *E. faecium*, можуть впливати на господаря за допомогою дофамінергічних шляхів [122].

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту

3.1.1. Наявність генетичних карт продуценту або типового представника групи

Streptococcus thermophilus - друга найбільш комерційно важлива стартова культура. Хоча дослідження в області фізіології *S. thermophilus* виявили важливу інформацію про деякі з властивостей, включаючи метаболізм цукру і білка, утворення полісахаридів і формування ароматів, і тільки недавно була встановлена генетична основа для багатьох з цих ознак.

Згідно з даними, отриманими з NCBI, 32 генома *S. thermophilus* були завершені [123]. Геном *S. thermophilus* становить 1,8 Мб, що робить його одним з найменших геномів усіх МКБ. Незважаючи на помірну термофільність, він філогенетично пов'язаний з більш мезофільними лактококами і має порівнянне низьке співвідношення G+C між 36,8 і 39%. Крім того, *S. thermophilus* відноситься до патогенних для людини штамів стрептококів, таких як *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* і *Streptococcus agalactiae* [124]. Однак найбільш важливі патогенні детермінанти або відсутні, або присутні у вигляді псевдогенів, якщо вони не кодують основні клітинні функції [125].

Streptococcus thermophilus ASCC 1275 (ST 1275) це типова молочна стартова бактерія, яка дає найбільшу відому кількість (~1000 мг/л) ЕПС в молоці серед видів *S. thermophilus*. Генетична карта продуценту відображена на рис. 3.1.1.1.[126].

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Іванова А.О.			РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	42	129
						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівник		Жолнер Л.Г.						
Затвер.								

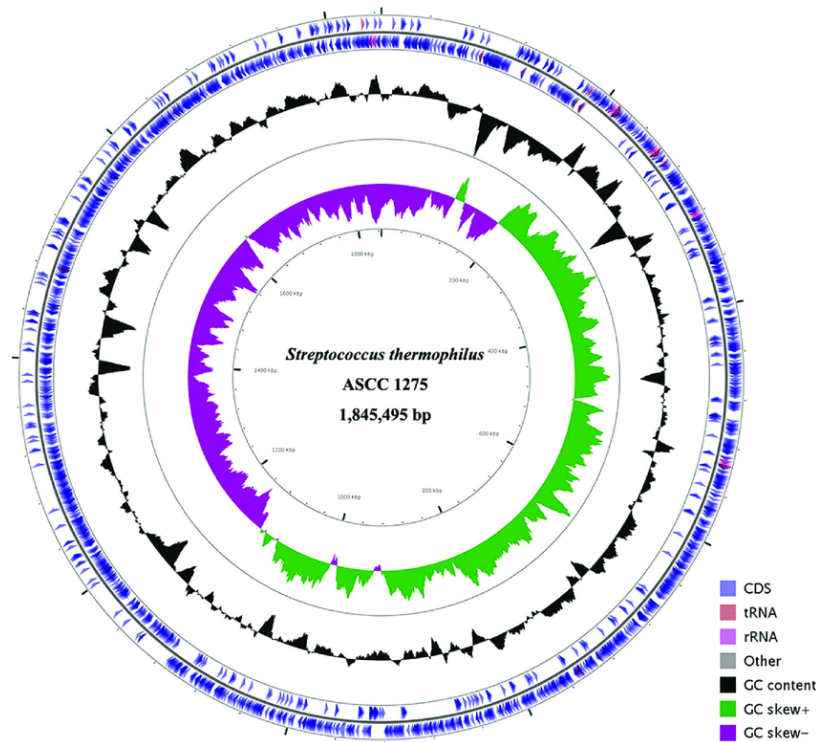


Рис.3.1.1.1. Кругова карта геному хромосоми *S. thermophilus* ASCC 1275. Геном безплазмідної ST 1275 становить 1 845 495 з середнім вмістом GC 39,1%. Коловий геном був згенерований сервером CGView 59 [126].

Вид *E. faecium* складається з окремих субпопуляцій або «клад» [127]. Глибоке філогенетичне розщеплення відрізняє клади А і В один від одного, причому клади В містять більшість комменсальних ізолятів людини. Клада А була додатково поділена на клади А1 і А2 [128]. Клітини А1 містять переважно більшість штамів, виділених у клінічних умовах. Поліфілетична клада А2 збагачена штамми, виділеними з домашніх тварин і домашньої худоби [129]. У той час як стійкість до ванкоміцину може бути виявлена серед штамів як з групи А1, так і з групи А2, штамми групи А1 майже завжди стійкі до ампіциліну, тоді як штамми з інших груп в основному чутливі до ампіциліну [130].

E. faecium - генетично динамічний організм з відкритим пангеномом [131]. Геномні зміни в *E. faecium* в основному обумовлені рекомбінацією і горизонтальним переносом генів, а не мутаціями [132]. Через частий ГПГ штамми *E. faecium*, які мають дуже схожі основні геноми, можуть мати істотні

відмінності в своїх додаткових геномах. Елементи послідовності вставки (IS) присутні в геномі *E. faecium*. Події вставки можуть привести до порушення промоторів, що кодують послідовності або структури оперона. Крім того, вони можуть каталізувати геномні перебудови, в тому числі делеції, інверсії і дуплікації в бактеріальних геномах [133]. Повні послідовності генома показали, що десятки елементів IS розкидані по хромосомі і плазмідам клінічних ізолятів *E. faecium*.

Штам *E. faecium* TX16 є першим секвенованим штамом даного виду. Геном *E. faecium* TX16 складається з однієї хромосоми і трьох плазмід. Хромосома (рис.) містить 2698137 пар основ з яких 2703 кодуючими білок відкритими рамками зчитування, 62 тРНК, 6 копій рибосомальної рРНК і 32 інших некодуючих РНК. Вміст хромосоми в хромосомі становить 38,15%, і воно демонструє явний перекіс GC на початку реплікації (рис. 3.1.1.2) [134]. Розміри трьох плазмід (pDO1, pDO2 і pDO3) становлять 36 262, 66 247 і 25 тисячі дев'ятсот двадцять шість пар основ, які кодують 43, 85 і 283 відкрити рамку зчитування відповідно.

Розмір геному штамів *E. faecium* істотно варіюється від 2,50 Мб (E1039) до 3,14 Мб (1 230 933), в той час як кількість відкритих рамок зчитування варіюється від 2587 (E1039) до 3118 (TX0133A). Значна частина генома *E. faecium* є допоміжною.

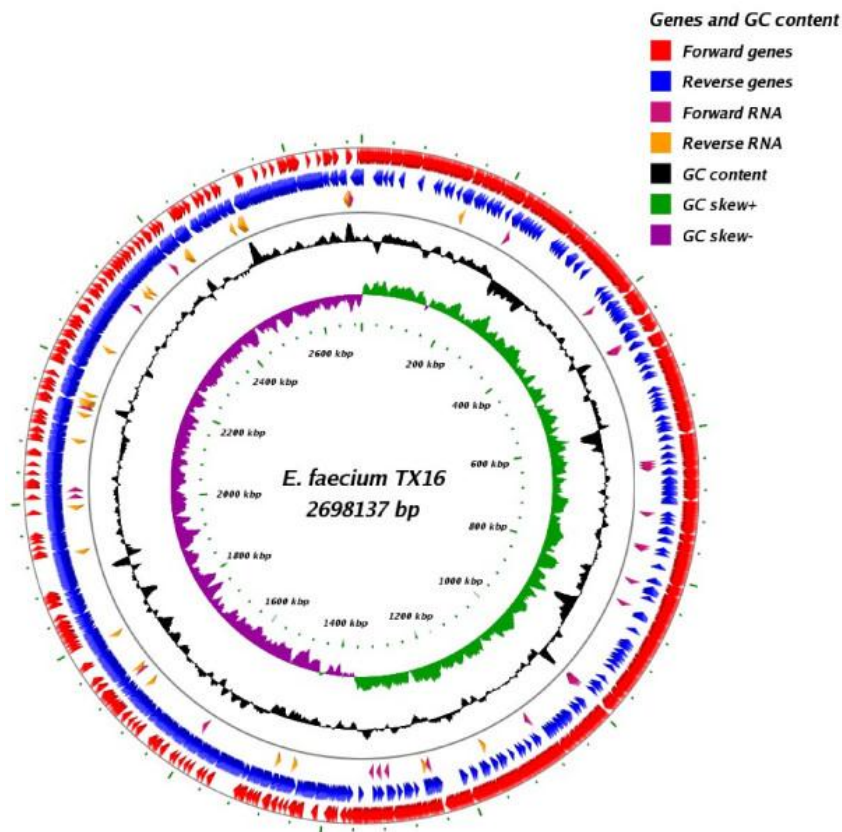


Рис.3.1.1.2. Кругова карта геному *E. faecium* TX16.

Позначення зсередини назовні: зсув GC (G-C) / (G + C), вміст GC, пряма і зворотна РНК, зворотні гени і прямі гени [134].

3.1.2. Вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів синтезу

S. thermophilus містить гени гліколітичного шляху, неокислювальної ланки пентозофосфатного шляху і метаболізму пірувату; не має гена, що кодує піруваткарбоксилазу, яка необхідна для утворення оксалоацетата з пірувату. Штами *S. thermophilus* демонструють різні відмінності з іншими видами *Streptococcus* в геномі [135, 136].

Деякі дослідження показують, що протеолітична система, метаболізм азоту, утилізація цукру і транспортні системи *S. thermophilus* дуже важливі при адаптації до молочного середовища [137]. Відмінності основних генів різних штамів полягають головним чином в біосинтезі бактеріоцинів і ЕПС, метаболізмі пептидів, генах, пов'язаних зі стійкістю до фагів, і ін..

S. thermophilus віддає перевагу лактозі перед глюкозою в якості основного джерела вуглецю і енергії. *lac* оперон контролює транспорт і гідроліз лактози, і його транскрипція індукується при рості на лактозі. Він кодує пермеазу лактози (LacS) і цитоплазматичну β -галактозидазу (LacZ). Лактоза розщеплюється на глюкозу і галактозу за допомогою LacZ. Глюкоза фосфорилується глюкокіназою до глюкозо-6-фосфату, а потім використовується далі по шляху гліколізу. Галактоза перетворюється в глюкозо-1-фосфат за допомогою шляху Лелуара, який складається з регулятора GalR, галактокінази (GalK), галактозо-1-фосфатуридилтрансферази (GalT), УДФ-глюкозо-4-епімерази (GalE) і галактозомутаротаза (GalM). Було виявлено, що вони організовані в кластер генів *galRKTEM* [138].

Нуклеотиди цукру діють як молекули-попередники ЕПС і формують залишки цукру в реакціях глікозилювання, в результаті яких синтезуються полісахариди [139]. Біосинтез ЕПС регулюється і визначається кластером генів *eps*. Біосинтез ЕПС пов'язаний з плазмідами в *L. lactis* [140]. Однак всі кластери генів *eps* *S. thermophilus* розташовані на хромосомі. Як правило, генні кластери *eps* містять гени, що беруть участь в регуляції продукції ЕПС (*epsA*, *epsB*), визначенні довжини ланцюга ЕПС (*epsC*, *epsD*), утворення повторюваних ланок (*epsE*, *epsF*, *epsG*, *epsH* і *epsI*) і полімеризацію та експорт ЕПС (*epsK*, *epsL* і *epsM*) [141]. 5'-кінець генних кластерів *eps* є геном *deoD*, який імовірно кодує пуринову нуклеотидфосфорилазу і бере участь в біосинтезі та катаболізмі нуклеотидів. Встановлено, що ген *orf14.9*, розташований нижче більшості кластерів генів *eps*, пов'язаний з ростом клітин *S. thermophilus* [142].

Рівень ароматичних сполук може бути поліпшений з використанням молекулярної біотехнології. Здатність генерувати важливі метаболіти *S. thermophilus* поліпшується за рахунок експресії гена α -ацетолактатсинтази (*als*) і гена алкогольдегідрогенази (*adhB*). Високі рівні 2,3-бутандіолу і

етанолу досягаються шляхом надмірної експресії гена *als* або гена *adhB* в *S. thermophilus* [143]. Ці метаболіти покращують смак молочного продукту.

Як вже було зазначено, *Streptococcus thermophilus*, на відміну від багатьох інших грампозитивних бактерій, надає перевагу лактозі в якості основного джерела вуглецю і енергії. Крім того, лактоза поглинається не фосфоенолпіруватзалежною фосфотрансферажною системою (ФФС), а виділеним переносником LacS.

Катаболітна репресія (КР) у бактерій - це явище використання джерела вуглецю, що швидко метаболізується, в живильному середовищі шляхом пригнічення використання інших субстратів. У грампозитивних бактерій з низьким рівнем G+C механізм КР чітко відрізняється від механізму КР грамнегативних бактерій. Катаболітний контрольний білок А (CsrA) є центральним регулятором КР, як було вперше показано для *Bacillus subtilis*, для якого він забезпечує репресію глюकोзи в гені α -амілази [144]. CsrA є членом сімейства бактеріальних регуляторних білків LacI-GalR і, мабуть, широко поширений серед грампозитивних бактерій з низьким вмістом G+C [145]. Гени, що піддаються КР, зазвичай містять чутливий до катаболітів елемент (*cre*) поблизу їх промоторних областей [146]. Було показано, що CsrA зв'язується з цими *cre*-сайтами. Іншим важливим фактором в цьому механізмі контролю катаболітів є фосфотранслятор ФФС HPr. У *B. subtilis* високі концентрації гліколітичного проміжного фруктозо-1,6-дифосфата запускають АТФ-залежну протеїнкіназу, яка фосфорилує HPr в залишку Ser-46. Як наслідок, P-Ser-HPr підсилює зв'язування CsrA з *cre* і, отже, пов'язує гліколітичну активність з КР. Контроль катаболітів CsrA включає не тільки репресію генів і оперонів, але також і активацію.

Глюкоза є класичним прикладом цукру ФФС, що швидко метаболізується в більшості бактерій. Однак глюкоза не є джерелом вуглецю ФФС для *Streptococcus thermophilus* і є поганим субстратом для росту [147]. Лактоза також не є цукром ФФС для цього організму, але є дуже хорошим субстратом для росту, на якому зростання відбувається навіть швидше, ніж

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		47

на цукрі ФФС, такому як сахароза. Це вказує на те, що *S. thermophilus*, добре адаптований до росту на лактозі як первинному джерелі вуглецю і енергії.

Роль контрольного білка катаболітів *S. thermophilus* CsrA в тонкій регуляції транспорту і гідролізу лактози і гліколітичного потоку без ФФС була встановлена шляхом клонування, характеристики і руйнування гена *csrA*. Було виявлено, що CsrA репресує оперон *lacSZ*, що кодує лактозопермеазу і β -галактозидазу, яка знаходиться під позитивним контролем активатора GalR. Навпаки, було виявлено, що ген, який кодує лактатдегідрогеназу, транскрипційно активується CsrA. Вестерн-блот аналіз показав, що утворення CsrA залежить від джерела цукру. До того ж, накопичення CsrA в клітинах, культивованих на глюкозі, відбувається в два рази інтенсивніше, ніж в клітинах, вирощених на лактозі. Регуляція утворення CsrA у *S. thermophilus* може відбуватись на рівні транскрипції як негативна ауторегуляція, як було виявлено для деяких, але не для всіх інших генів *csrA*. Перевірка послідовності *csrA* показала наявність двох *cre*-подібних елементів. Альтернативний механізм ауторегуляції за участю двох сайтів *cre* може полягати в тому, що CsrA зв'язується з цими сайтами, утворюючи петлю ДНК, тим самим пригнічуючи активність промотору *csrA*. Ушкодження гена *csrA* серйозно порушує ріст *S. thermophilus*, що також спостерігалось для інших грампозитивних бактерій. Як на ФФС (сахарозі), так і на не ФФС (глюкозі, лактозі і галактозі) цукрі ріст мутантів з порушенням *csrA* спричинює тривалу фазу затримки і знижену максимальну швидкість росту.

CsrA-опосередкована КР у грампозитивних бактерій з низьким G+C залежить від внутрішньоклітинних кількостей фруктозо-1,6-дифосфата, так як відносно високі концентрації цього гліколітичного проміжного продукту стимулюють HPr-кіназу в *B. subtilis* для перетворення HPr в P-Ser-HPr. LacS-пермеаза *S. thermophilus* є дуже швидкою і ефективною системою для поглинання лактози, яка сприяє високому притоку глюкози в гліколіз. При максимальній швидкості росту *S. thermophilus* P-Ser-HPr, мабуть, є

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		48

домінуючим фосфорильованим видом, тоді як P-His-HPr домінує в стаціонарній фазі. Це відображає відносно високу концентрацію внутрішньоклітинного фруктозо-1,6-дифосфата, який згодом викликає КР промотора *lacS*. Метаболізм галактози при відносно повільному шляху Лелуара, ймовірно, призводить до недостатніх внутрішньоклітинних концентрацій фруктозо-1,6-дифосфата для індукції СсрА-опосередкованої репресії. КР *lac* оперона у *S. thermophilus* може бути не стільки залежною від джерела вуглецю, скільки визначається швидкістю гліколізу щодо поглинання цукру, при якій концентрація фруктозо-1,6-дифосфата може діяти як внутрішньоклітинний індикатор цього гліколітичного потоку. За відсутності функціонального СсрА клітини не тільки поглинають лактозу і виділяють галактозу, щонайменше, в чотири рази швидше, ніж клітини дикого типу, але також демонструють значне зниження кількості лактату, що виділяється.

Експресія *S. thermophilus ldh* регулюється цукром і опосередковується СсрА. Сайт *cre*, виявлений в області промотора *ldh*, розташований вище блоку -35, що узгоджується з позитивним контролем СсрА. Індукція *ldh* є найвищою під час росту на лактозі і знижується під час росту на глюкозі і галактозі. Під час експоненціального росту *S. thermophilus* має здатність переносити лактозу, яка перевищує максимальну швидкість гліколізу щонайменше в два рази, що дозволяє припустити, що гліколіз знижує загальну ємність перенесення лактози для задоволення максимального гліколітичного потоку. Це суперечить ситуації з іншими бактеріями, де поглинання субстрату ФФС є основним чинником, що обмежує швидкість метаболізму цукру. Під час пізнього експоненціального і стаціонарного росту P-His-HPr стає переважаючою фосфорильованою формою HPr, що вказує на те, що транспорт лактози, ймовірно, обмежує швидкість.

Таким чином, СсрА бере участь в тонкій регуляції швидкості транспорту лактози з гліколітичною активністю, забезпечуючи швидку ферментацію і високу швидкість росту *S. thermophiles* [148].

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		49

3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту

Харчова промисловість постійно прагне розробляти нові продукти для задоволення вимог споживачів, які постійно змінюються, і строгих обмежень регулюючих органів. Для харчових продуктів, заснованих на мікробній ферментації, це розширює межі мікробної активності і вимагає постійного розвитку нових заквасочних культур з новими властивостями. Оскільки використання інгредієнтів в харчовій промисловості строго регламентоване і знаходиться під пильною увагою споживачів, використання технології рекомбінантної ДНК для поліпшення мікробіологічної активності в даний час не розглядається. Використання зазначених маніпуляцій обмежене можливим непередбачуваним впливом біологічного агенту на організм господаря (людини або тварини), а також на екосистеми. Деякі дослідники вважають, що це може бути пов'язано з появою у інтродуцентів нових властивостей, що підсилюють їх конкурентоспроможність, а також порушенням рівноваги екосистем [149,150]. Крім того, активно обговорюється можливість неконтрольованого перенесення рекомбінантних ДНК новим господарям. Молочнокислі бактерії, в тому числі і представники родів *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, завдяки своїй безпеці для людини і широкій поширеності як в харчовій, так і у фармацевтичній промисловості, давно привертають увагу фахівців генної інженерії. Однак використанню молочнокислих бактерій в якості об'єктів для клонування перешкоджає слабка в порівнянні з іншими класичними об'єктами (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*) вивченість їх генетики і відповідних векторів клонування. Сама процедура трансформації до недавнього часу була трудомісткою і малоефективною [151]. В результаті акцент на поліпшення штамів для мікробної ферментації робиться на класичних методах (рис. 3.2.1) [152], які включають в себе випадковий мутагенез, спрямовану еволюцію і схеми домінантного відбору.

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		50

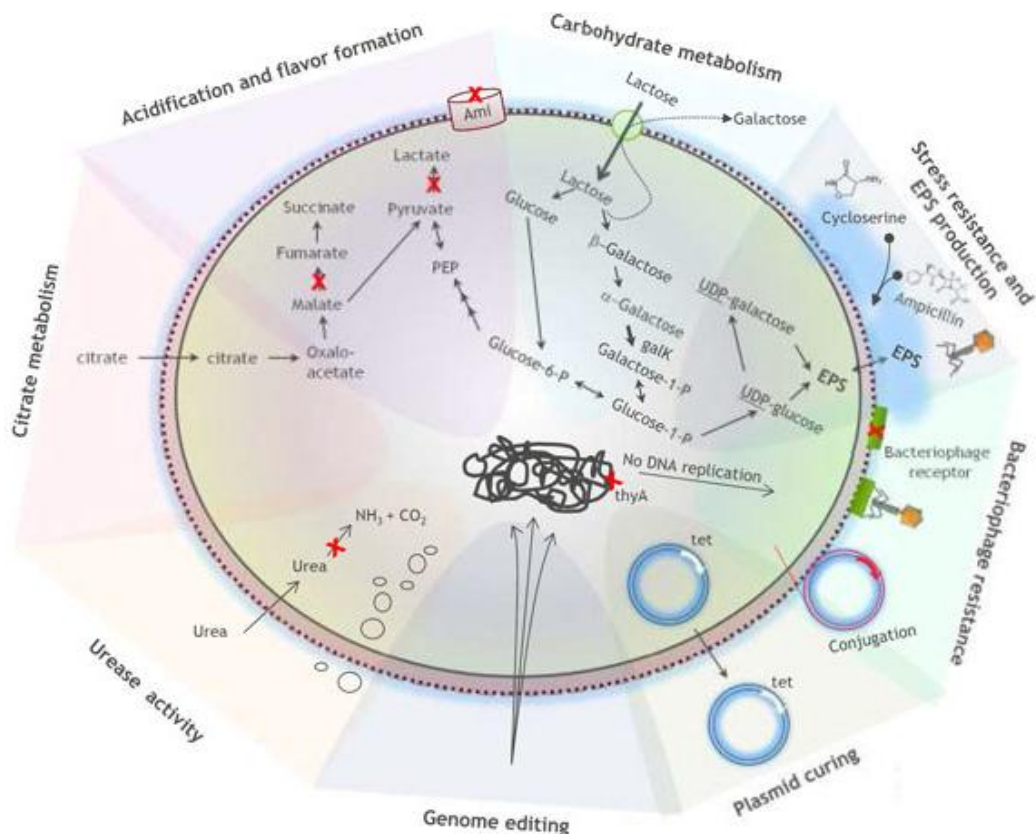


Рис.3.2.1. Схематичне зображення різних класичних способів поліпшення штамів молочнокислих бактерій.

Хрестик (X) виділяє положення мутацій або їх вплив [152].

■ Модифікація бактеріальних клітинних поверхонь

Поверхня бактеріальних клітин знаходиться в прямому контакті з зовнішнім середовищем і, як очікується, буде брати участь у зв'язуванні його компонентів та формуванні текстури молока під час ферментації. Раніше було встановлено, що біосинтез ЕПС сильно залежить від штаму і тісно пов'язаний з генотипом *Streptococcus thermophilus* і особливо з генетичним вмістом кластера генів *eps* [153].

Для подальшого використання ролі клітинної поверхні у формуванні текстури в ферментованому молоці застосовується стратегія домінантного відбору для виділення мутантів зі змінами клітинної поверхні. Відбір ґрунтується на стійкості до сполук, що впливають на біосинтез компонентів клітинної поверхні, а саме D-цикloserин (D-4-аміноізоксазолідон) і ампіцилін. D-цикloserин є антибіотиком, який пригнічує ферменти, що

беруть участь у метаболізмі D-аланіну, і може викликати лізис клітин [154]. Ампіцилін є антибіотиком, який пригнічує транспептидазу, відповідальну за зшивання пептидоглікана, а також може викликати лізис клітин [155]. Деякі мутанти показують зниження синерезису молочної сироватки після підкислення молока і поліпшення текстури, що визначається виміром реології [156]. Попередні експерименти показують, що у цих мутантів є зміни на їх клітинних поверхнях, які впливають на їх взаємодію з зовнішнім середовищем.

▪ Оптимізація метаболічного шляху ЕПС

Більшість штамів *S. thermophilus* не здатні рости на галактозі як єдиному джерелі вуглецю, незважаючи на присутність інтактних генів, що кодують необхідні ферменти. Збільшення вироблення ЕПС у *S. thermophilus* спостерігається після посилення активності ферментів в метаболічному шляху галактози (наприклад, фосфоглюкомутази і глюкозо-1-фосфатуридилілтрансферази) шляхом генетичних маніпуляцій [157]. Крім того, продукування ЕПС деякими штамми *S. thermophilus* було збільшено за рахунок генетично спрямованого посилення активності галактокінази. Стосовно методів поліпшення реологічних параметрів кисломолочних продуктів шляхом зміни ферментативної активності в метаболічному шляху галактози без використання методів рекомбінантної ДНК наразі дані відсутні.

▪ Уреазонегативні мутанти *S. thermophilus*

Традиційно сир готують шляхом зброджування молока з *L. lactis* [158]. Останнім часом використання *S. thermophilus* в якості закваски для сиру набуло популярності завдяки більш високій швидкості підкислення, що призводить до прискорення процесу виробництва в молочних продуктів і значного збільшення продуктивності.

S. thermophilus володіє активністю амідогідролази (уреази), яка перетворює сечовину в аміак і діоксид вуглецю [159]. Вуглекислий газ включається в частинки сиру, змушуючи їх плавати, що перешкоджає

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		52

видаленню сироватки і призводить до втрати сирної маси. Для вирішення цієї проблеми за допомогою спонтанного мутагенезу було виділено уреазо-негативний мутант *S. thermophilus* CHCC4895. Мутанти, позбавлені уреазної активності, не володіють буферною здатністю через зниження вироблення аміаку. Таким чином роль *S. thermophilus* є потенційним кандидатом при використанні сирних культур на основі уреазі негативних мутантів [160].

▪ Кислотоутворення

Виробництво кислоти з допомогою молочнокислих бактерій є бажаною властивістю для модуляції і контролю. Для отримання поліпшених штамів *S. thermophilus* зі зниженим підкисленням була досліджена важливість транспорту олігопептидів для придатності до росту *S. thermophilus* в молоці. Транспортна система олігопептидів *S. thermophilus* складається з семи білків (AmiA1, AmiA2, AmiA3, AmiC, AmiD, AmiE і AmiF). Було виявлено, що мутанти зі зміненою системою транспорту олігопептидів мають знижену швидкість підкислення [161]. Токсичний аналог олігопептида аміноптерин транспортується в клітину по системі Ami. Ami-дефіцитні мутанти зі зниженою здатністю до підкислення в молоці ізолюють шляхом відбору мутантів, які є стійкими до цього аналогу [162].

▪ Зміна підкислюючих властивостей шляхом адаптації вуглеводного обміну

При вирощуванні в молоці більшість штамів *S. thermophilus* поглинають лактозу і виділяють галактозу через галактозо-лактозний анти порт [163]. У сирі моцарела галактоза, яка виділяється, може привести до «потемніння» при нагріванні сиру. Це пояснюється реакцією Майяра, де галактоза, яка відновлює цукор, реагує з аміногрупами з амінокислот. Крім того, надлишок вільної галактози може привести до проблем після підкислення і дисбалансу у флорі сиру через зростання резидентних молочнокислих бактерій. Тому цікаві галактозо-позитивні штами дикого

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		53

типу або мутанти, що ферментують галактозу, особливо з метою зменшення потемніння в сирі для піци.

Більшість штамів *S. thermophilus* не здатні рости на галактозі як єдиному джерелі вуглецю; а ті, які ростуть, використовують шлях Лелуара. Майже всі штами містять гени *gal*, але мутації, які зустрічаються в природі в промоторі *galK* призводять до поганої експресії [164]. Оскільки більшість штамів містять інтактний ген *gal*, є можливість виділити з них позитивні по галактозі варіанти. Мутанти можуть бути відібрані на чашках М17 з галактозою в якості єдиного джерела вуглецю і охарактеризовані секвенуванням ДНК.

Таким чином, існує можливість зміни багатьох характеристик промислових продуцентів, які роблять штам більш технологічним. До них відносяться: підвищення стійкості до бактеріофагів, поліпшення створеної текстури для виробництва кисломолочних продуктів, усунення небажаних ознак при ферментації, поліпшення стресостійкості і модуляція кількості кислот, що утворюються. Класичне поліпшення штаму може поєднуватися з природними методами перенесення генів, такими як кон'югація, трансдукція та природна трансформація для створення промислових штамів з покращеними властивостями.

Останні досягнення в області редагування геному можуть надати додаткові способи поліпшення продуктивності штаму. Такі технології, як рекомбінування [165] і використання системи CRISPR-Cas9 [166], дозволяють точно модифікувати на рівні одного нуклеотиду цільовий геном.

Сама генетична модифікація вважається проблематичною як з точки зору законодавства, так і з точки зору споживача. На сьогоднішній день жоден з генетично модифікованих штамів молочнокислих бактерій (ГМ МКБ) не був представлений на ринку для лікування або в якості харчових добавок. Замість цього індустрія зосередилася на тому, щоб уникнути використання технології рекомбінантних ДНК. Проблеми в розробці ГМ

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		54

МКБ і способи подолання потенційних проблем і досягнення нормативного прийняття представлені схематично на рис.3.2.2.[167].



Рис. 3.2.2. Обмеження в розвитку генетично модифікованих молочнокислих бактерій (ГМ МКБ) і способи подолання потенційних проблем [167].

ГПГ: горизонтальний перенос генів. CRISPR: короткі паліндромний повтори, регулярно розташовані групами

Дослідження безпеки на МКБ показали, що вони можуть легко розвинути стійкість до антибіотиків. Велика частина доступних даних була отримана від умовно-патогенних ентерококів, особливо ванкоміцин-резистентних ентерококів, які можуть викликати рецидивуючі внутрішньолікарняні інфекції [168]. Проте, інші МКБ також можуть проявляти резистентність, включаючи коменсалів, пробіотиків з родів *Lactobacillus*, *Streptococcus* і *Enterococcus*. Хоча ця резистентність в основному відноситься до ванкоміцину, вона також може бути віднесена до інших антибіотиків, таких як еритроміцин, тетрациклін, гентаміцин, хлорамфенікол та інші [169-171].

➤ Системи відбору без антибіотиків

Вектори експресії і доставки генів, вільні від генів стійкості до антибіотиків, були розроблені для підвищення безпеки продукту. Відповідно до їх механізмів дії, ці системи можуть ґрунтуватися на ауксотрофності, неантибіотичних домінантних і комплементарних маркерах,

постсегрегаційному знищенні, РНК-інтерференції або дерепресії необхідного гена [172]. Неантибіотичні домінантні селекційні маркери прості і залежать від їх присутності в плазміді. Приклади домінантних маркерів відбору залежать від стійкості до бактеріоцинів або стійкості до важких металів [173]. У *L. lactis* стійкість до кадмію (Cdr) і стійкість до міді (Cur) були описані як визначальні чинники стійкості до важких металів. Отримані таким чином вектори стабільно експресуються в *L. lactis* [174] і успішно застосовується до *S. thermophilus* [175]. Інший домінантний маркер селекції був розроблений на основі плазмиди *shsp* з *S. thermophilus*, яка кодує білок з гомологією до невеликих білків теплового шоку. Ця система не залежить від бактеріоцинів або важких металів і була перенесена в різні штами *S. thermophilus* і *L. lactis*. Рекомбінантна плазміда, яка несе ген *shsp*, забезпечує селекцію при 60°C або pH 3.5, а трансформовані штами демонструють ріст при 52°C [176].

Неантибіотичні системи маркерів комплементарної селекції засновані на комплементатії специфічних мутацій в хромосомному гені, який кодує результативну фазу в певному метаболічному шляху або надає певні властивості організму. Вектор експресії, який несе комплементатію, конструюється, щоб доповнювати делецію гена в хромосомі господаря. Системи на основі ауксотрофності маркерів у МКБ в основному залежать від комплементатії тиміну або цитидину [177]. Ген α -галактозидази (*aga*) *Lactococcus raffinolactis* володіє фенотипом ферментації мелібіози, і було показано, що він є ефективним маркером селекції харчової якості для *L. lactis*, *Pediococcus acidilactici* [178] і *S. thermophilus* [179].

Постсегрегаційне знищення забезпечується плазмідами з парою генів токсину і антитоксину. Втрата плазмиди виснажує антитоксин в клітині і дозволяє токсину впливати на неї, що призводить до загибелі конкурентних вільних від плазмід клітин. Крім того, були запропоновані системи токсин-антитоксин для запобігання горизонтального переносу генів [180]. Ген антитоксина включається в плазмиду, і втрата плазмиди призведе до загибелі

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		56

клітин. Токсин-антитоксинові системи були розроблені як для грам негативних [181], так і для грампозитивних [182] бактерій.

РНК-інтерференційні системи також можуть бути використані в якості альтернативних маркерів відбору. Вони використовують РНК, яка може втручатися в комплементарну послідовність, яка, таким чином, може пригнічувати експресію і трансляцію гена. Була розроблена плазміда з необхідним геном *murA*, який бере участь в синтезі клітинної стінки під контролем оператора тетрацикліну (*tet*). Ген *murA* був репресований кодованим геном *tet*- репресором. За відсутності плазміди експресія *murA* придушувалася *tetR*, що призводило до загибелі клітин. У бактерій, що несуть плазмиду, РНК-інтерференція спрямована на послідовність *tetR*. Як наслідок, *tetR* репресується, що призводить до дерепресії *murA* і росту клітин [183,184].

Системи стійкості до сполук, які не є антибіотиками в якості маркерів відбору також включають гени, які надають стійкості до зазначених речовин. За допомогою плазмід і використання маркерів селекції відбувається інтеграція хромосомних генів, яка забезпечує стабільність і знижує ризик горизонтального переносу генів [185].

➤ Використання гомологічної ДНК

З регуляторної точки зору бажано включати тільки ДНК з гомологічного господаря (тобто цисгенну ДНК) або з організмів GRAS (Generally recognized as safe - загальноновизнані як безпечні) в генній інженерії. Навпаки, впровадження ДНК інших видів призводить до трансгенних організмів, які строго розглядаються регулюючими органами як ГМО [186]. Було сконструйовано клонуєчий вектор харчового призначення pUBU з 4,46 т.п.н., який складається з трьох основних компонентів з організмів, схвалених до харчового використання: реплікон тета-типу з *Tetragenococcus halophilus*, промотор гена L-лактатдегідрогенази (*ldhL*) з *L. plantarum* та детермінанта лактококової стійкості до кадмію (Cdr) в якості домінуючого

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		57

маркера відбору. Даний вектор був ефективний для трансформації кількох родів МКБ, включаючи *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* і *Tetragenococcus*, і був стабільний в бактеріях без впливу відбору [187].

➤ Білки поверхні

Гетерологічне зв'язування рекомбінантного білка з поверхнею немодифікованої бактерії дозволило б використовувати не-ГМО і менш складну регуляторну процедуру [188]; проте, потрібне підтвердження відсутності рекомбінантної ДНК і життєздатних рекомбінантних бактеріальних клітин. Кілька гетерологічних систем відображення білку були успішно розроблені в МКБ. Ендолизин Lyb5, що був об'єднаний з GFP і експресований в *E.coli*, був прикріплений до поверхні різних МКБ, включаючи *L. lactis*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus* і *S. thermophilus* [189]. Білок S-шару SlpB (LcsB) *Lactobacillus crispatus*, злитий з GFP, аналогічним чином тестований на зв'язування з декількома штамми МКБ. Було здійснено зв'язування білка з клітинами *L. delbrueckii*, *L. brevis*, *L. helveticus*, *L. crispatus*, *Lactobacillus salivarius*, *S. thermophilus* і *L. lactis*. Флуоресценція клітин *Lactobacillus* була більш інтенсивною, ніж у *L. lactis* і *S. thermophiles* [190].

Для забезпечення можливості застосування ГМ МКБ в харчовій промисловості були розроблені системи експресії харчової якості, які забезпечують заміну маркерів стійкості до антибіотиків з використанням альтернативних маркерів і використанням гомологічної ДНК. Проте, розробка штамів для використання в харчових продуктах все ще ґрунтується на класичних методах без ГМО [191].

Відповідно до переліку мікроорганізмів, в тому числі тих, що мають генетично модифіковані аналоги, що використовуються в харчовій промисловості в світі, генетично модифіковані аналоги, придатні для використання у виробництві харчових продуктів включають в себе *S.*

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		58

thermophilus, що містить ген синтезу ЕПС; *S. thermophilus*, що містить ген хлорамфенікол-ацетилтрансферази. Представники роду *Enterococcus*, в тому числі *Enterococcus faecium* наразі не мають відповідних модифікованих аналогів, дозволених до використання у виробництві харчових продуктів [192].

Важливим є зазначити, що колекція промислових штамів ІПР НААН, в тому числі тих, що входять до складу Іпровіт-Стрептосан, відрізняється тим, що вони є природними і не підлягали будь-яким модифікаціям геному [193].

3.3. Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

Як зазначається, Державне дослідне підприємство Інституту продовольчих ресурсів - єдиний вітчизняний виробник бактеріальних заквасок в Україні. Відповідно до вже згаданого, колекція пробіотичних молочнокислих бактерій ІПР НААН представлена штамми, виділеними з природних джерел методами природної селекції і спеціально відібрані з урахуванням корисних властивостей; бактерії з колекції підприємства не піддавалися генетичним модифікаціям і впливу мутагенних чинників. Мікроорганізми підбираються з урахуванням особливостей і складу молочної сировини українського виробництва. Кількість молочнокислих мікроорганізмів в бактеріальних препаратах і заквасках Іпровіт забезпечуються на рівні не менше 10 млрд [194].

Проектувальник, яким є автор дипломного проекту, залишає за собою право на нерозголошення комерційно значимих нюансів виробництва заквасок «Іпровіт», в тому числі пробіотичної закваски «Стрептосан», не компрометуючи підприємство. Також зазначається, що проектоване виробництво, представлене у роботі, враховує та відображає усі принципові технологічні рішення, що можуть бути застосовані для виробництва продуктів-аналогів, а тому має право на існування.

Відбір промислових продуцентів відбувається з урахуванням їхньої функціональної активності. Водночас, до продуцентів висувається ряд вимог,

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		59

що слугують критеріями відбору пробіотичних штамів. Таким чином, врахування ключових технологічних і функціональних характеристик штаму є визначальним фактором відбору (табл. 3.3.1).

Таблиця. 3.3.1. Основні параметри відбору біологічно активних штамів заквасочних культур [194]

Технологічні	Функціональні
Здатність до розвитку у молоці	Джерело походження
Аеротолерантність	Стійкість до метаболітів травної системи: - HCl, NaCl, фенолу
Вид ферментації	Адгезія до епітеліальних клітин
Стабільність кислотності за зберігання продукту	Колонізація шлунково-кишкового тракту
Рівень ферментативної активності	Утворення антибіотичних сполук
Забезпечення смаку та ароматичного букету під час виробництва та зберігання продукту	Антагонізм щодо патогенних та умовно патогенних бактерій
Конкурентоздатність зі сторонньою мікрофлорою	Холестеразна активність
Ростові характеристики бактерій та здатність до спільного росту у композиціях	Безпека при використанні
Стійкість до технологічних операцій	Клінічно підтверджений вплив на здоров'я

Типова схема відбору, впроваджена ІПР НААН дозволяє виділяти мікроорганізми з природних джерел існування та отримувати високопродуктивні штами «харчової якості» (рис. 3.3.1) [195].

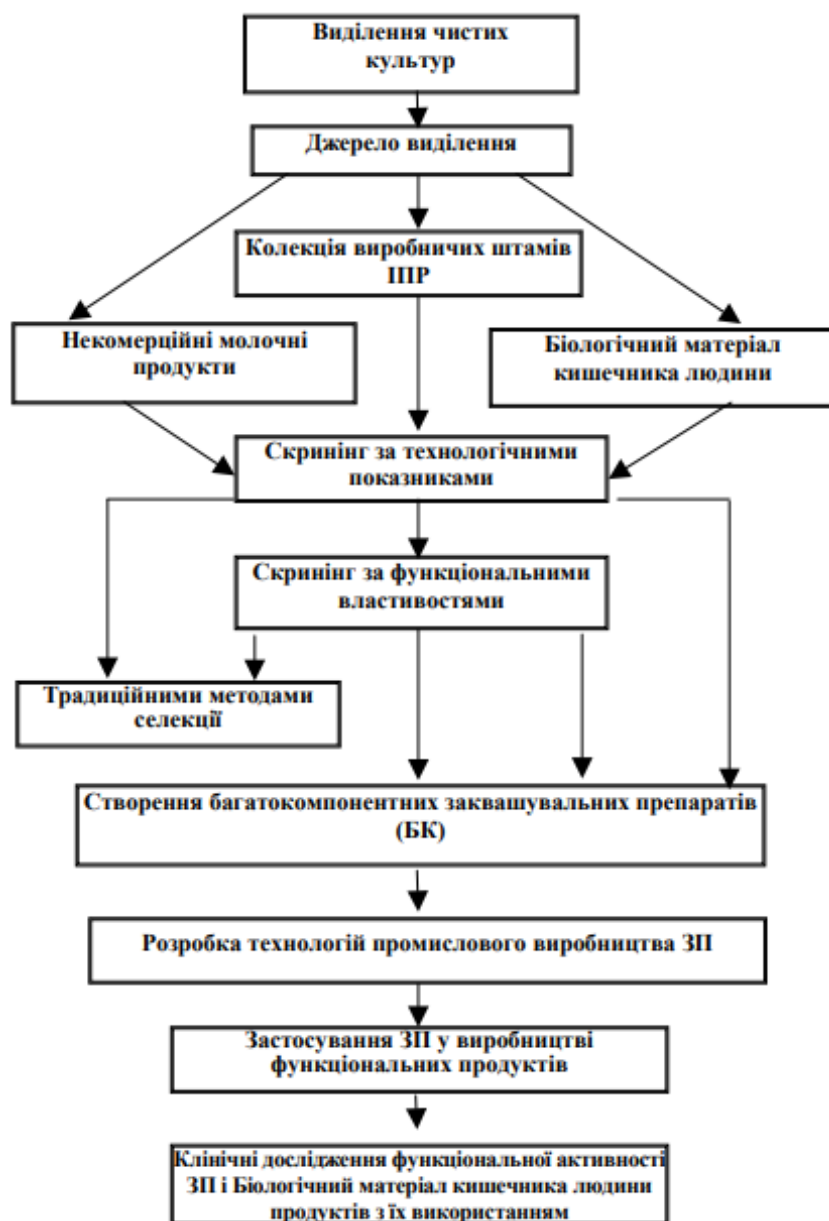


Рис. 3.3.1. Схема одержання біологічних агентів заквашувальних препаратів.
ЗП – заквашувальні препарати [195].

Колекція продуцентів ІП НААН включає Захищений Патентом України № 91441 штам *Streptococcus thermophilus* 1MB B-7179, що був виділений у результаті спрямованої селекції культури, вилученої із самоквасного молочного продукту.

Вибір штаму *Streptococcus thermophilus* 1MB B-7179 як компоненту проектованого препарату обумовлений низкою його пробіотичних властивостей: стійкість до продуктів метаболізму травної системи людини

(концентрацій жовчі до 40%), здатність до адгезії (індекс адгезивності $IA=11,2\pm1,4$), виражена антагоністична дія по відношенню до широкого кола патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів (представників родів *Proteus*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Enterobacteria* та *Pseudomonas*), висока холестеразна активність. Зазначається, що згаданий штам характеризується високотехнологічністю через ряд переваг: фагостійкість, помірна енергія кислотоутворення в молоці, утворення згустків з високою в'язкістю. Штам проявляє високу біотехнологічну активність, що дає змогу одержувати молочні продукти функціональної дії.

Штам *Enterococcus faecium* L-3 був віділений зі сквашеного молока (сметани) шляхом численних пересівів (не менш, ніж 20 пасажів) індивідуальних колоній ентерококів на щільних агаризованих середовищах з подальшим аналізом функціональних характеристик. Використання даного селекціонованого штаму у даній роботі обґрунтовується наступними його характеристиками. Безпечність штаму для людини підтверджена численними клінічними дослідженнями. Штам є високотехнологічним: зберігає життєздатність в діапазоні температур від 0 до 50°C, здатен рости при високих концентраціях солі (6% NaOH) стійкий до жовчі і низьких значень рН (до 3.0). Штам характеризується високою чутливістю до левоміцетину, еритроміцину, ванкоміцину, тетрацикліну, ципрофлоксацину, цефазоліну, цефалотину; стійкістю до гентаміцину, рифампіциліну, оксациліну, цефуроксиму, цефотаксиму, цефалексину, метициліну, тобраміцину. Є високоадгезивним; характеризується високим рівнем утворення вітамінів групи В. Штам *Enterococcus faecium* L-3 застосовується в медичній, харчовій і мікробіологічній промисловості для отримання лікарських препаратів і виготовлення продуктів харчування [196].

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		62

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва

Бактеріальна пробіотична закваска «Стрептосан» має відповідати вимогам якості ТУ У 15.5-00419880-100:2010 «Культури заквашувальні сухі та рідкі. Технічні умови».

Крім того, на даний препарат поширюються вимоги ISO 27205:2010 Продукты кисломолочные. Бактериальные закваски. Стандарт идентичности та вимоги ГОСТ 34372-2017 ЗАКВАСКИ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ. ОБЩИЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ.

Стандарти якості ISO 27205:2010 Продукты кисломолочные. Бактериальные закваски. Стандарт идентичности наступні.

Життєздатні бактерії

Кількість життєздатних клітин, виражене в колонієутворюючих одиницях на грам, має відповідати специфікаціям, заявленим виробником або постачальником заквасочних культур.

Загалом, бактеріальні заквасочні культури містять більш 10^8 КУО/г або 10^8 КУО/см³ життєздатних бактерій. Замість підрахунку життєздатних клітин для певних цілей можуть бути використані інші альтернативні нові технології, такі як випробування на активність кислотоутворення, визначення консистенції, оптичної щільності, випробування із застосуванням рідинної цитометрії або інші.

Забруднювачі

Заквасочні культури повинні відповідати специфікаціям, наведеним в таблиці 4.1.1. Мікробіологічні критерії гігієни процесу та безпеки харчових

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Іванова О.Т.			РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	Стадія	Аркуш
Консульт.						Д	63
							129
Керівник		Жолнер Л.Г.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ	
Затвер.							

продуктів встановлюються для визначення правильності проведення технологічного процесу і безпеки продукту.

Таблиця 4.1.1 - Специфікації

Тип критерію	Забруднювачі ^a	Одиниці	Рідкі і заморожені закваски	Сухі закваски
Гігієна процесу	Не молочнокислі ^b бактерії	КУО/г	<500	<501
	Дріжджі і пліснява	КУО/г	<1	<10
	Ентеробактерії	КУО/г	<1	<10
	Коагулазопозитивні стафілококи	КУО/г	<1	<10
Безпечність харчових продуктів	Сальмонели (<i>Salmonella spp.</i>)	Відсутність/присутність в 1 г	Відсутні	Відсутні
	Лістерії (<i>Listeria monocytogenes</i>)	Відсутність/присутність в 1 г	Відсутні	Відсутні
<p>^a Забруднення можуть перевірятися в робочому середовищі, в технологічних пробах або зразках продукції. Порівняння проб з навколишнього середовища з технологічними пробами і зразками продуктів повинно бути засноване на принципах НАССР та відповідати зазначеним тут специфікаціям.</p> <p>^b Цей критерій забруднення відноситься до культур, які містять тільки молочнокислі бактерії.</p>				

Інші мікробіологічні критерії випробування або інші концентрації, які не визначені в таблиці 1, можуть бути прийнятними в залежності від застосування заквасок культури.

Виробник повинен встановити заходи контролю для запобігання можливого перехресного забруднення від інших продуктів, які могли б вплинути на якість даного продукту.

Необхідно також встановити необхідні наступні перевірки на перехресне забруднення продукту, технологічних проб або технологічного обладнання.

Інформація про продукт

- Маркування

Маркування повинне відповідати національному законодавству, де це прийнятно.

На етикетці продукту повинна бути представлена наступна інформація:

- а) назва продукту;
- б) вид продукту (наприклад, мезофільна культура) або бактеріальний склад згідно з міжнародною науковою номенклатурою;
- в) вид продукту (наприклад, ліофілізований, концентрований);
- г) вміст, який може бути виражений в одній з наступних систем одиниць: грами, мілілітри, одиниці, дози (згідно будь-якого застосовується правилом);
- д) ім'я та адреса виробника, пакувальника, дистриб'ютора, імпортера, експортера або продавця;
- е) країна-виробник (необов'язково);
- ж) код і ідентифікація партії;
- з) термін придатності (місяць і рік);
- і) умови зберігання.

- Технічні дані

Наступна інформація повинна бути надана користувачеві:

- а) сферу застосування;
- б) інструкції по використанню (тривалість сквашування, температура інкубації і ін.);
- в) склад (вид бактерій, вид культури і т.д.);
- г) сертифікат аналізу, сертифікат відповідності або аналогічна інформація.

За органолептичними та фізико-хімічними показниками бактеріальні закваски (БЗ) і бактеріальні концентрати (БК) повинні відповідати вимогам ГОСТ 34372-2017 ЗАКВАСКИ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ. ОБЩИЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ, зазначеним в таблиці 4.1.2.

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		65

Таблиця 4.1.2. Органолептичні та фізико-хімічні показники бактеріальних заквасок (БЗ) і бактеріальних концентратів (БК)

Найменування показника	Характеристика і норма для БЗ і БК		
	Рідкі	Заморожені	Сухі
Зовнішній вигляд	Однорідна рідина	Однорідна заморозжена маса і/або гранули різної форми і розмірів	Порошкоподібна маса, і/або гранули різної форми і розмірів, і/або таблетки
Колір	Від світло-кремового до світло-коричневого або колір наковнювача		
Масова частка вологи, %	—	—	Від 2 до 6

Транспортування та зберігання

БЗ або БК перевозять в транспортних засобах відповідно до правил перевезення вантажів, що діють на транспорт відповідного виду, або поштовими посилками, або бандеролями відповідно до вимог поштових правил, затверджених на території держави, яка прийняла цей Стандарт.

Терміни придатності та умови зберігання встановлює виробник заквасок у відповідних документах на конкретні БЗ і БК.

Способи застосування БЗ і БК

При виробництві молочної продукції конкретні БЗ і БК застосовують відповідно до рекомендацій виробників заквасок шляхом:

- прямого внесення в молоко або суміш для вироблення продукту;
- попередньої активізації для подальшого внесення в молоко або суміш для вироблення продукту;
- приготування виробничої закваски.

4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

Таблиця 4.2.1. Характеристика сировини та матеріалів

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
1. Основна сировина			
1.1. Поживне середовище для виробничого культивування	ГОСТ 31658-2012 Молоко обезжиренное - сырье. Технические условия	Масова частка жиру, не більше 0,5 %	Молоко знежирене
		Масова частка білку, не більше 2,8%	
		Кислотність, 16,0-21,0 Т ⁰	
		Густина, не більше 1030,0 кг/м ³	
1.2. Натрій лимоннокислий 5.5-водний	ГОСТ 22280-76 Реактивы. Натрий лимоннокислый 5.5-водный. Технические условия	Масова частка 5,5-водного лимоннокислого натрія (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·5,5H ₂ O), не менше 99,5%	Чистий для аналізу
		Масова частка нерозчинних у воді сполук, не більше 0,003%	
		рН розчину препарату з масовою часткою 10% - 7,5-8,5	
1.3. Сахароза	ГОСТ 5833-75 Реактивы. Сахароза. Технические условия	Масова частка кислот у перерахунку на оцтову кислоту, не більше 0,005%	Чистий для аналізу
		Масова частка нерозчинних у воді сполук, не більше 0,003%	
		Масова частка інвертованого цукру, не більше 0,05%	
2. Допоміжна сировина			
2.1. Вода питна	ДСТУ ISO 3696:2003 Вода для застосування в лабораторіях. Вимоги та методи перевіряння (ISO 3696:1987, IDT)	Чиста безкольорова рідина	Фінішне ополіскування обладнання і комунікацій
		Електропровідність за 25°C, максимальна, 0,01 мСм/м	
2.2. Водний розчин 25%-го аміаку	ГОСТ 9-92 Аммиак водный технический. Технические условия	Масова частка аміаку, не менше 25%	Марка А - для різних галузей промисловості
2.3. Мийно-дезінфікуючий розчин	Средство синтетическое моющее-дезинфицирующее "Дезмол" МРТУ 18/255-68	Синтетичні миючі компоненти (алкілсульфати, алкілсульфонати) - 1%	Стадії допоміжних робіт
3. Матеріали			

3.1. Біологічні індикатори	ДСТУ EN ISO 11138-3:2019 Стерилизация изделий медицинского назначения. Биологические индикаторы. Часть 3. Биологические индикаторы для стерилизации влажным теплом (EN ISO 11138-3:2017, IDT; ISO 11138-3:2017, IDT)	Кількість живих організмів від -50% до +300% від встановленого значення	Перевірка стерилізаційних процедур
3.2. Хімічні індикатори	ДСТУ EN ISO 11140-1:2019 Стерилизация медицинской продукции. Химические индикаторы. Часть 1. Общие требования (EN ISO 11140-1:2014, IDT; ISO 11140-1:2014, IDT)	Стан індикатора після витримки в стерилізаційному режимі після видимого зміни повинно залишатися незмінним при зберіганні в умовах, зазначених виробником, протягом не менше 6 місяців після його використання.	Перевірка стерилізаційних процедур

4.3. Опис технологічного процесу

ДР 1 Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1 Підготовка персоналу

ДР 1.1.1 Медичний огляд працівників

Працівники мають проходити попередній (під час прийняття на роботу) і періодичні (протягом трудової діяльності) медичні огляди відповідно до плану-графіку проведення медичних оглядів, затверджених закладами охорони здоров'я (ст. 26 Закону України «Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення»). Факт проходження медогляду записується у журналі контролю, ведення якого адресується до контролю Кт.

ДР 1.1.2 Переодягання персоналу

Спецодяг робочого персоналу є однією з вимог для збереження продуктів харчування і захисту продукції від мікробіологічних і механічних забруднень. Зміна і прання одягу проводиться в більшості випадків після кожної робочої зміни (або частіше, у міру необхідності). Контроль за виконанням – безпосередньо на працівниках підприємства.

ДР 1.2 Підготовка миючих та дезінфікуючих засобів

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		68

Розчини (0,25-0,5% -й) готують безпосередньо перед застосуванням шляхом розчинення наважки у технічній воді температури $50 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Застосування Дезмолу дозволяє поєднати в одній операції миття та дезінфекцію обладнання. Для промивання без використання спеціальних пристроїв використовують розчин з концентрацією 0,5%, з використанням – 0,25%. Контролі, що проводяться: Кт, Кх.

ДР 1.3 Підготовка виробничого приміщення

ДР 1.3.1 Щоденне прибирання

Щоденне прибирання проводиться з метою видалення часточок пилу і бруду з поверхонь виробничого приміщення. Прибирання здійснюється з використанням мийно-дезінфікуючих засобів, зміна яких проводиться кожні 2-3 місяці для запобігання розвитку резистентності у мікроорганізмів.

ДР 1.3.2 Генеральне прибирання

Генеральне прибирання проводиться у відведений для цього підприємством час не рідше одного разу на місяць. Прибирання здійснюється з використанням мийно-дезінфікуючих засобів, зміна яких проводиться кожні 4-5 прибирань для запобігання розвитку резистентності у мікроорганізмів.

ДР 1.4 Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.4.1 Мийка обладнання

Миття водою проводять з метою очищення від залишків біомаси або культуральної рідини. Подається вода технічна, промивання триває близько 30 хвилин, при цьому контролюється рН відходів рідких (води стічної), яке повинно становити 6,5-8,5; температура води - 80°C . Проводяться контролі: Кт, Кх. Основні параметри процесу контролюються за допомогою контрольно-вимірювальних приладів. Відпрацьована вода поступає через місцевий трубопровід в збірник нейтралізації перед скидом у централізовану систему каналізації. У збірниках проводиться нейтралізація розчинів, тобто доводиться рН до близько 7, тому збірники оснащені рН-метрами.

ДР 1.4.2 Дезінфекція обладнання

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		69

Миття продовжують розчином Дезмолу упродовж 30 хвилин при температурі розчину $40 \pm 5^{\circ}\text{C}$, що поступає від магістрального, а далі через місцевий трубопровід. Відпрацьований розчин Дезмолу поступає через місцевий трубопровід в збірник нейтралізації перед скидом у централізовану систему каналізації. Контроль, що проводиться: Кт.

ДР 1.4.3 Ополіскування обладнання

Ополіскування проводиться водою питною за температури 80°C , яка подається по магістральному, а далі місцевими трубопроводами. Ополіскування ферментера триває упродовж 30 хвилин. Контролі, що проводяться: Кт, Кх. рН води, що передається у централізовану систему каналізації, має бути близьким до нейтрального.

ДР 1.4.4 Технічний огляд і перевірка на герметичність

Тетрахлорметан по магістральному, а далі по місцевим трубопроводам закачують в герметично закриті обладнання до тиску 0,5 МПа та за допомогою датчика -течешукача галогенопохідних проводять огляд. Тривалість процесу – близько 30 хв. Особливу увагу приділяють фланцевим з'єднанням та ущільненню кришок. У випадку виявлення нещільних з'єднань проводять розбір та профілактичне ущільнення обладнання та комунікації. Для з'єднань проводять їх підтягування та перепаковування, а для обладнання підтягування кришок, або з'єднань і в випадку необхідності заміну ущільнюючих прокладок люків та кришок. Контроль: Кт.

ДР 1.5 Стерилізація обладнання та комунікацій

ДР 1.5.1 Промивання гарячою водою

Перед стерилізацією обладнання і комунікації промивають гарячою водою температури близької до кипіння ($99,9^{\circ}\text{C}$), що поступає з магістрального трубопроводу, а далі по місцевим. Контроль, що проводиться: Кт. Відпрацьована вода подається на стадію переробки відходів по місцевим трубопроводам.

ДР 1.5.2 Стерилізація парою

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		70

Стерилізація проводиться гострою парою при температурі пари 110°C, за тиску 0,2 МПа упродовж 1,5 год. Пара подається як в середину апаратів, так і в прилеглі комунікації, що на апаратурній схемі зображені як термічні затвори. В процесі стерилізації водяна пара утворює вторинну водяну пару та конденсат, які відводяться із апарату через місцеві трубопроводи. Вхід/вихід пари і вихід конденсату регулюються і контролюються витратомірами, що встановлені на відповідних трубопроводах. Контролюється температура вхідної/вихідної вторинної пари, а також тиск у трубопроводах, який вони створюють. Контроль: Кт.

ДР 1.5.3 Охолодження

Обладнання та комунікації після стерилізації гострою парою охолоджуються упродовж 3,5 годин. Кінцева температура повинна бути оптимальною для початку культивування і становити 30-35°C. Мікробіологічний контроль полягає у використанні біологічних індикаторів 3MTMAttestTMRapid Readout та хімічних індикаторів 3MTMComplyTM. Валідацію методу стерилізації потрібно проводити не рідше одного разу на рік.

ДР 2 Підготовка вентиляційного повітря

ДР 2.1 Забір повітря

Забір повітря проводиться з атмосфери за допомогою трубчастих конструкцій висотою 8-10м. Труба розташовується в місцях з мінімальною запиленістю та загазованістю. При заборі повітря контролюється його кількість за допомогою системи манометрів і витратомірів, встановлених на трубопроводах.

ДР 2.2 Груба очистка повітря

Попередня очистка повітря від механічних контамінантів має своєю метою видалення аерозольних механічних часток та попередження абразивного пошкодження компресійної апаратури. Для виконання цієї операції використовують фільтри попередньої очистки - уніфіковані

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		71

коміркові масляні фільтри типу Фя. Вони встановлюються на всмоктуючий лінії перед компресором і дозволяють видалити частки розміром більше 5 мкм. Таке очищення дозволяє позбутися пилу, крапель вологи та частково мікроорганізмів. Як правило коефіцієнт проскоку від загального вмісту твердої фази (пилу) складає 10%. Контроль на цій стадії проводиться за допомогою вимірювання різниці тисків на вході та виході з фільтра. Таке вимірювання проводиться двома манометрами встановленими на вхід та вихід з фільтра.

ДР 2.3 Компресування повітря

Атмосферне повітря попередньо очищене від механічних часток пилу стискають до потрібного тиску і направляють у систему повітропостачання. Нагнітання повітря здійснюється за допомогою турбокомпресора, який здійснює адіабатне стискання повітря до тиску 0,3 МПа, внаслідок чого повітря може розігріватися до 120-200 °С.

ДР 2.4 Стабілізація термодинамічних показників повітря

Для охолодження повітря при виході з компресора його направляють у теплообмінник, так як процес ферментації припускає подачу повітря з температурою не більше 45°C. Для охолодження повітря в теплообміннику використовують воду технічну температури близько 18°C . Контроль, що проводить – Кт – адресується до контролю температури повітря на виході з апарату та його вологості.

ДР 2.5 Відділення вологи

Охолодження повітря дозволяє видалити з нього частину вологи у ресивері до значення 40%. Основне призначення ресиверу – згладжування пульсацій у тиску при роботі компресійного обладнання та видалення крапельної вологи. Конденсат відводиться на переробку відходів.

ДР 2.6 Очищення повітря в головному фільтрі

Очищення повітря здійснюється за допомогою глибинного набивного фільтра періодичної дії. Заміна фільтруючого матеріалу проводиться 2 рази на рік. В якості фільтруючого матеріалу використовується скловолокно з

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		72

діаметром 7 – 21мкм. Контроль ефективності очистки на рівні 99% здійснюється через пробовідбір повітря до і після фільтру і належить до валідаційних процедур, що здійснюються при заміні фільтра або відповідно до інструкції на підприємстві. Очищене повітря подається для вентиляції виробничих приміщень, а також на додаткову стадію підготовки для отримання стерильного аераційного повітря на стадії 3.

ДР 3 Підготовка стерильного аераційного повітря

ДР 3.1 Стерилізація повітря в індивідуальному фільтрі

Стерилізація повітря здійснюється у фільтрах, в яких використовуються змінні готові стандартні фільтруючі патрони. Фільтри тонкої очистки практично забезпечують майже 100%-ву очистку і стерилізацію повітря (ефективність очистки 99,999%). Вони стерилізуються гострою парою в технологічній обв'язці з ферментером без видалення фільтруючих елементів з корпусу фільтра. Контроль ефективності дії фільтрів записується аналізатором запиленості очищеного повітря.

ДР 4 Підготовка та стерилізація поживного середовища

ДР 4.1 Підготовка та стерилізація поживного середовища для музейної культури *Enterococcus faecim*

Для відновлення музейної культури використовується L-бульон по Miller. Для його приготування розчиняють 15,5 г середовища в 1 л дистильованої води, нагрівають до повного розчинення, стерилізують в автоклаві 15 хвилин при 121°C при тиску 0,2 МПа. Перевіряють рН готового середовища, яке має становити 7,0±0,2. Використовують додаткові засоби контролю режиму стерилізації (максимальні термометри та тест-смужки).

ДР 4.2. Підготовка та стерилізація поживного середовища для музейної культури *Streptococcus thermophilus*

Для відновлення музейної культури використовується М17-бульон. Для його приготування розчиняють 42,25 г середовища в 1 л дистильованої води, нагрівають до повного розчинення, стерилізують в автоклаві 15 хвилин

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		73

при 121°C при тиску 0,2 МПа. Перевіряють рН готового середовища, яке має становити $7,1 \pm 0,2$. Використовують додаткові засоби контролю режиму стерилізації (максимальні термометри та тест- смужки).

ДР 4.3 Підготовка та стерилізація поживного середовища для виробничого культивування

В якості поживного середовища використовується знежирене молоко. Прийнята за доцільну періодична термічна стерилізація, яка використовується у виробництвах з малою продуктивністю, або при використанні ферментерів місткістю до 32 м³. Метод відрізняється простотою і надійністю. Середовище нагрівається до заданої температури 110°C подачею насиченої пари температурою 135°C в сорочку ферментера об'ємом 1 м³ (розведення середовища конденсатом є небажаним процесом) впродовж 30 хвилин при тиску пари 0,35 МПа. Мікробіологічний контроль адресується до контролю якості стерилізації молока і здійснюється не рідше 2-3 разів на тиждень. Відібрані зразки повинні відповідати вимогам стерильності. Для визначення стерильності зразки зі стерилізованим молоком термостатують при 37°C протягом 3 діб. Після термостатної витримки проводять огляд зразків продукту. Зразки без зовнішніх проявів контамінації аналізують органолептичним методом. Продукт відповідає вимогам промислової стерильності якщо не встановлено змін смаку і консистенції.

ДР 5 Підготовка та стерилізація захисного середовища

ДР 5.1 Змішування компонентів захисного середовища

Для стабілізації біомаси готують захисне середовище наступного складу (в г/дм³): тризаміщений лимоннокислий натрій - 50, сахароза -100, вода питна - до 1дм³. Кінцева концентрація компонентів: цитрату натрія 5%, сахарози – 10%. Сипучі компоненти подаються у збірник через об'ємно-вагові дозатори, вода питна – через магістральні, а потім місцеві трубопроводи.

ДР 5.2 Стерилізація захисного середовища

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		74

Стерилізацію проводять за допомогою подачі глухої насиченої пари за наступних режимів: температура стерилізації близько 121°C, тиск 0,2 МПа, час стерилізації 15-20 хв. Використовують додаткові засоби контролю режиму стерилізації (максимальні термометри та тест- смужки).

ТП 6 Підготовка посівного матеріалу

ТП 6.1 Відновлення музейної культури *Enterococcus faecim*

Внесення музейної бактеріальної культури в стерильне поживне середовище від ДР 4.1 здійснюються за допомогою стерильного посуду та інструментів. 1% чистої культури штаму *Enterococcus faecim* L-3 у асептичних умовах вносять у колби зі 100 мл поживного середовища. Інкують при 37±2°C впродовж 16 год. Концентрація живих бактерій штаму *Enterococcus faecim* L-3 наприкінці культивування має бути не меншою, ніж 1·10⁹ КУО на грам рідкого поживного середовища. Концентрацію біомаси визначають методом прямого висіву з наступним підрахунком колоній і розрахунком їх кількості у відповідному об'ємі. Можливі відходи, які включають в себе контаміновані зразки, скlobій, некондиційну продукцію тощо направляють на стадію знешкодження відходів.

ТП 6.2 Відновлення музейної культури *Streptococcus thermophiles*

Внесення музейної бактеріальної культури в стерильне поживне середовище від ДР 4.2 здійснюються за допомогою стерильного посуду та інструментів. 1% чистої культури штаму *Streptococcus thermophiles* 1MB B-7179 у асептичних умовах вносять у колби зі 100 мл поживного середовища. Інкують при 37°C впродовж 10 год. Можливі відходи, які включають в себе контаміновані зразки, скlobій, некондиційну продукцію тощо направляють на стадію знешкодження відходів.

ТП 6.3 Вирощування *Enterococcus faecim* у інокуляторі

Внесення музейної бактеріальної культури в стерильне поживне середовище від ДР 4.1 здійснюються за допомогою стерильного посуду та інструментів. 3% чистої культури штаму *Enterococcus faecim* L-3 у

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		75

асептичних умовах вносять у інокулятори місткістю 100 л. Інкують при 37°C впродовж 16 год при інтенсивності перемішування 50-70 об/хв без аерації. Створення асептичних умов забезпечується повною герметизацією і одноразовою подачею стерильного аераційного повітря, що створює надлишковий тиск усередині ферментера близько 1,5 кПа. Можливі відходи, які включають в себе контаміновані зразки, склобій, некондиційну продукцію тощо направляють на стадію знешкодження відходів.

ТП 6.4 Вирощування *Streptococcus thermophiles* у інокуляторі

Внесення музейної бактеріальної культури в стерильне поживне середовище від ДР 4.2 здійснюються за допомогою стерильного посуду та інструментів. 3% чистої культури штаму *Streptococcus thermophiles* 1MB В-7179 у асептичних умовах вносять у інокулятори місткістю 100 л. Інкують при 37°C впродовж 10 год при інтенсивності перемішування 50-70 об/хв без аерації. Створення асептичних умов забезпечується повною герметизацією і одноразовою подачею стерильного аераційного повітря, що створює надлишковий тиск усередині ферментера близько 1,5 кПа. Можливі відходи, які включають в себе контаміновані зразки, склобій, некондиційну продукцію тощо направляють на стадію знешкодження відходів.

ТП 7 Виробниче культивування

Виробниче культивування відбувається в ферментері об'ємом 1 м³ з коефіцієнтом заповнення 0.7, кількість внесеного інокулюму – 5%. Режим культивування: температура 37±1°C, інтенсивність перемішування 50-70 об/хв без аерації, тривалість 12 годин. Підтримання, відповідно до технології, температурних режимів нарощування біомаси - за допомогою подачі теплої води в рубашку реактора. Вихід біомаси становить (7,83±0,02) г з кожного дм³ середовища. Створення асептичних умов забезпечується повною герметизацією і одноразовою подачею стерильного аераційного повітря, що створює надлишковий тиск усередині ферментера близько 1,5 кПа. Можливі відходи, які включають в себе контаміновані зразки, некондиційну продукцію тощо направляють на стадію знешкодження відходів.

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		76

ТП 8 Стабілізація рН культуральної рідини

Ріст і розмноження асоціації культур біологічних агентів спричинює підкислення культуральної рідини головним чином за рахунок продукування ними молочної кислоти як основного метаболіту. Оскільки оптимальним рН для росту визначено значення 6.6 ± 0.2 , підтримання рН проводиться з використанням водного розчину аміаку (концентрацією 25 %), що асептично подається до ферментера за допомогою регулятора рН Consort R 362, діапазон вимірювання рН $0,01 - 14,0 \pm 0,01$ рН. Температурний діапазон роботи Consort R 362 від 30 до 130 °С.

ТП 9 Охолодження біомаси

Охолодження починається при досягненні емпірично визначеного значення кислотності для припинення росту бактерій і, таким чином, для збереження активності закваски на високому рівні. Перед фракціонуванням біомаси від культуральної рідини проводять охолодження біомаси циркулюванням холодної води в рубашці ферментера до температури 10 – 12 °С.

ТП 10 Фракціонування культуральної рідини

Відокремлення біомаси бактерій від культурального середовища проводять з використанням бактофуги – центрифуги з високим фактором розділення 142000 із частотою обертання 15000 об/хв впродовж 10 хвилин. Мінімальний діаметр частинок, що відділяються, – $5 \cdot 10^{-4}$ мм. Фугат подається через місцевий трубопровід в збірник нейтралізації перед скидом у централізовану систему каналізації. Проводиться бактеріологічний контроль чистоти центрифуги та відбір біомаси для мікробіологічного контролю. Регулювання об'ємів культуральної рідини, що подається на центрифуги відбувається за результатами аналізу фугату на предмет залишкової кількості бактеріальних клітин.

ТП 11 Змішування біомаси із захисним середовищем

Перемішування біомаси із стерильним захисним середовищем від ДР 5.2, що подається через місцевий трубопровід, відбувається у співвідношення

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		77

1:2 у реакторі для змішування мокрої біомаси з захисним середовищем. Проводиться мікробіологічний контроль змивів з обладнання для змішування.

ТП 12 Заморожування і сублімаційна сушка

Заморожування виконується в ліофілізаторі IVF 650/2D (який складається з камери попередньої заморозки та сублімаційної камери). На першому етапі заморожування температурні умови підтримуються в межах мінус 60 ± 1 °C. Наповнення стерильних лотків з нержавіючої сталі сумішшю біомаси та захисного середовища відбувається товщиною не більше 1,5 см. Лотки накриваються стерилізованими кришками з нержавіючої сталі і розміщуються на полиці камери попереднього заморожування. В морозильній камері підтримуються стерильні умови. Спостереження за температурним режимом здійснюється за допомогою станції управління та збору даних «Yokogawa» CX 2220-3-2-A6-M1- PG1-S23. Тривалість заморожування – 16 ± 2 години. Далі відбувається переміщення лотків з біомасою в сублімаційну камеру. Температурні умови від мінус 24°C до 32°C, та утворення вакууму для вилучення вологи – 10 Па. Тривалість процесу близько 24 годин. Можливі відходи, які включають в себе контаміновані зразки, некондиційну продукцію тощо направляють на стадію знешкодження відходів.

ТП 13 Подрібнення сухої біомаси

Подрібнення сухої біомаси проводять за допомогою промислового міксера. Вологість сухого препарату - не більше 5 %. Проводиться мікробіологічний контроль змивів з обладнання для подрібнення сухої біомаси. Контроль вологості повітря для проведення фасування, яка має не перевищувати 70%, виконується за допомогою термогігрометра ВІТ1 та ВІТ2. Можливі відходи, які включають в себе контаміновані зразки, некондиційну продукцію тощо направляють на стадію знешкодження відходів.

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		78

ТП 14 Фасування біомаси

Фасування продукту здійснюється у стерильні флакони з кришками, стерилізація яких є загальною для всіх продуктів, що випускаються на виробництві, і здійснюється в окремому цеху. Автоматичне фасування здійснюється дозатором шнековим ТБ 018-02 в стерильні, полімерні флакони з кришками зі складу та закупорюються за допомогою машини настільної закупорювальної ТБ 075. Дозування – по 0,5 г препарату у флакон. Контроль вологості повітря для проведення фасування, яка має не перевищувати 70%, виконується за допомогою термогігрометра ВІТ1 та ВІТ2. Некондиційна продукція направляється на стадію знешкодження відходів.

ПМВ 15 Етикетування та групове пакування

Автоматичне наклеювання етикеток на флакони здійснюється за допомогою машини етикетувальної автоматичного типу СК-010. Флакони пакуються в картонні коробки зі складу по 4 флакони у коробку, вкладається інструкція та здійснюється групове пакування в картонну упаковку по 10 коробок. Некондиційна продукція або готова продукція, що не пройшла візуальний контроль, направляється на стадію знешкодження відходів.

ЗВ 16 Знешкодження відходів та викидів

Знешкодження відходів та викидів включає в себе знешкодження повітряних викидів, твердих та рідких відходів; знешкодження некондиційної або готової продукції, що не пройшла контроль.

Виробничі води не повинні містити:

- зважених і спливаючих речовин в кількості більше 500 мг/л;
- речовин, здатних засмічувати труби каналізаційною мережі або відкладатися на стінках труб;
- речовин, що мають руйнуючу дію на матеріал труб і елементи споруд каналізації;
- шкідливих речовин в концентраціях, що перешкоджають біологічному очищенню стічних вод або скиданню їх у водоймище (з урахуванням ефекту очищення).

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		79

Температура цих вод не повинна перевищувати 40°C.

ПВ 17 Переробка відходів і викидів

Переробка відходів і викидів включає в себе регенерацію реагентів, регенерацію змінних елементів.

4.4. Матеріальний баланс

Виробничий біосинтез проходить у ферментері об'ємом 1 м³ з коефіцієнтом заповнення 0.7, тому розрахунок проводився на кількість культуральної рідини 0,7 м³ або 700 л.

За складеним балансом виробництва «Стрептосану» виробнича серія складає 8800 флаконів (по 0,5 г препарату) по 4 флакони у індивідуальній упаковці.

Таблиця 4.4.1. Матеріальний баланс виробництва

Використано					Отримано				
Стадія	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Стадія	Назва кінцевого продукту або напівпродукту, відходів та втрат	Кількість		
		кг	шт	л			кг	шт	л
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ТП 7	Поживне середовище			665	ТП 7	Культуральна рідина			669
	Посівний матеріал від ТП 6.3, 6.4			35		Втрати з виносом повітря (4,5%)			31
	Всього		700			Всього		700	
ТП 8	Культуральна рідина			669	ТП 8	Стабілізована культуральна рідина			673
	Водний розчин 25%-го аміаку			4					
	Всього		673			Всього		673	
ТП 9	Стабілізована культуральна рідина			673	ТП 9	Охолоджена культуральна рідина			673
	Всього		673			Всього		673	
ТП 10	Охолоджена культуральна рідина			673	ТП 10	Фугат			634,6
						Біомаса			4,4
						Втрати (5%)			34
	Всього		673			Всього		673	
ТП 11	Біомаса			4,4	ТП 11	Суміш біомаси і захисного середовища			13,2
	Захисне середовище			8,8					

	Всього	13,2				Всього	13,2		
ТП 12	Суміш біомаси і захисного середовища			13,2	ТП 12	Сухий препарат	5		
						Конденсат			7,5
						Втрати (5%)	0,7		
	Всього	13,2				Всього	13,2		
ТП 13	Сухий препарат	5			ТП 13	Подрібнений сухий препарат	4,7		
						Втрати (~5%)	0,3		
	Всього	5				Всього	5		
ТП 14	Подрібнений сухий препарат	4,7			ТП 14	Розфасований препарат "Стрептосану", у тому числі препарату флаконів з кришками	4,4	8800	
	Флакони з кришками		8800			Втрати (5%)	0,3		
	Всього	8804,7				Всього	8804,7		
ТП 15	Розфасований препарат "Стрептосану", у тому числі препарату флаконів з кришками	4,4	8800		ТП 15	Препарат "Стрептосану", у тому числі препарату флаконів з етикетками та інструкціями коробок	4,4	8800	
						групової тари		8800	
	Етикетки та інструкції		8800					2200	
	Коробок		2200					220	
	Групова тара		220						
	Всього	20024,4				Всього	20024,4		

4.5. Контроль виробництва

Таблиця 4.5.1. Перелік контрольних точок

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
1	2	3	4	5
ДР 1.2. Підготовка миючих та дезінфікуючих засобів ДР 1.2. Кх, Кт	Розчин Дезмолу; кількість Дезмолу, Температура розчину Дезмолу	Ваги, мірний посуд, візуально термометр, візуально	Кожну операцію	0,5%; 0,25% 50±5°C

ДР 1.4. Підготовка обладнання та комунікацій ДР 1.4.1. Кх, Кт	Режим мийки; рН відходів рідких, тиск струменя води, температура води, тривалість миття	Контрольно- вимірювальні прилади (КВП): рН-метр, манометр, термометр, реле часу	Кожну операцію	6,5-8,5 0,6 МПа 80°C 0,5 год
ДР 1.4. Підготовка обладнання та комунікацій ДР 1.4.2. Кт	Режим дезінфекції; температура мийно- дезінфікуючого розчину, тривалість дезінфекції	КВП: термометр, реле часу	Кожну операцію	40±5°C 0,5 год
ДР 1.4. Підготовка обладнання та комунікацій ДР 1.4.3. Кх, Кт	Режим ополіскування; рН відходів рідких, температура води, тривалість ополіскування	КВП: рН-метр, термометр, реле часу	Кожну операцію	~7 80°C 0,5 год
ДР 1.4. Підготовка обладнання та комунікацій ДР 1.4.4. Кт	Режим технічного огляду; тиск газу, тривалість процесу	КВП: манометр, реле часу	Кожну операцію	0,5 МПа 0,5 год
ДР 1.5. Стерилізація обладнання та комунікацій ДР 1.5.1. Кт	Режим промивання; температура промивної води	Термометр	Кожну операцію	97±2°C
ДР 1.5. Стерилізація обладнання та комунікацій ДР 1.5.2. Кт	Режим стерилізації; температура пари, тиск пари, тривалість стерилізації.	КВП: термометр, манометр, реле часу.	Кожну операцію	110°C 0,2 МПа 1,5 год
ДР 1.5. Стерилізація обладнання та комунікацій ДР 1.5.3. Кт, Кмб	Режим охолодження; температура обладнання і комунікацій, тривалість охолодження Ефективність стерилізації;	КВП: термометр, реле часу Хімічні та біологічні індикатори	Кожну операцію	35°C 3.5 год N<1 КУО

ДР 2 Підготовка вентиляційного повітря ДР 2.1 Кт	Кількість повітря	Витратомір	Кожну операцію	Відповідно до інструкції на виробництві
ДР 2 Підготовка вентиляційного повітря ДР 2.2 Кт	Різниця тисків на вході та виході з фільтра	Манометр на вході і виході з фільтра	При заміні фільтра або відповідно до інструкції на підприємстві	Не перевищує встановлену норму
ДР 2 Підготовка вентиляційного повітря ДР 2.3 Кт	Параметри процесу; температура тиск	КВП: термометр, манометр	Кожну операцію	120-200°C 0,3 МПа
ДР 2 Підготовка вентиляційного повітря ДР 2.4 Кт	Параметри процесу; температура вологість	КВП: термометр, гігрометр	Кожну операцію	20-30°C 40-60%
ДР 2 Підготовка вентиляційного повітря ДР 2.5 Кт	Параметри процесу; температура вологість	КВП: термометр, гігрометр	Кожну операцію	30-35°C 40%
ДР 2 Підготовка вентиляційного повітря ДР 2.6 Кт	Ефективність очистки повітря	Пробовідбір повітря	При заміні фільтра або відповідно до інструкції на підприємстві	99%
ДР 3 Підготовка стерильного аераційного повітря ДР 3 Кт	Ефективність очистки повітря	Аналізатор запиленості очищеного повітря	При заміні фільтра або відповідно до інструкції на підприємстві	99,999%
ДР 4. Підготовка та стерилізація поживного середовища ДР 4.1. Кт, Кх, Кмб	Режим процесу; температура пари, тиск пари, тривалість стерилізації, рН середовища. Ефективність стерилізації; Поживне середовище, кількість	КВП: термометр, манометр, реле часу рН-метр, тест-смужки Ваги, мірний посуд, візуально	Кожну операцію	121°C 0,2 МПа 15 хв 7.0±0.2 Відповідний колір смужки 15,5 г/л

ДР 4. Підготовка та стерилізація поживного середовища ДР 4.2. Кт, Кх, Кмб	Режим процесу; температура пари, тиск пари, тривалість стерилізації, рН середовища. Ефективність стерилізації; Поживне середовище, кількість	КВП: термометр, манометр, реле часу рН-метр, тест-смужки Ваги, мірний посуд, візуально	Кожну операцію	121°C 0,2 Мпа, 15 хв 7.1±0.2 Відповідний колір смужки 42,25 г/л
ДР 4. Підготовка та стерилізація поживного середовища ДР 4.2. Кт, Кмб	Режим процесу; температура пари, тиск пари, тривалість стерилізації. Ефективність стерилізації;	КВП: термометр, манометр, реле часу тест-смужки	Кожну операцію	135-140°C 0,35 МПа 60 хв Відповідний колір смужки
ДР 5. Підготовка та стерилізація захисного середовища ДР 5.1. Кх	Цитрат натрія, кількість Сахароза, кількість	Ваги, мірний посуд, візуально Ваги, мірний посуд, візуально	Кожну операцію	5% 10%
ДР 5. Підготовка та стерилізація захисного середовища ДР 5.2. Кт, Кмб	Режим процесу; температура пари, тиск пари, тривалість стерилізації. Ефективність стерилізації;	КВП: термометр, манометр, реле часу тест-смужки	Кожну операцію	121°C 0,2 МПа 15-20 хв Відповідний колір смужки
ТП 6. Підготовка посівного матеріалу ТП 6.1. Кт, Кмб	Режим процесу; температура, тривалість, концентрація бактерій, асептика	КВП: термометр, реле часу прямий висів, візуально, герметичність обладнання	Кожну операцію	37±2°C 16 год 1·10 ⁹ КУО/г асептичність
ТП 6. Підготовка посівного матеріалу ТП 6.2. Кт, Кмб	Режим процесу; температура, тривалість, асептика	КВП: термометр, реле часу герметичність обладнання	Кожну операцію	37°C 10 год асептично

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу ТП 6.3. Кт, Кмб	Режим процесу; температура, тривалість, інтенсивність перемішування асептика	КВП: термометр, реле часу, тахометр, герметичність обладнання	Кожну операцію	37°C 16 год 50-70 об/хв асептично
ТП 6. Підготовка посівного матеріалу ТП 6.4. Кт, Кмб	Режим процесу; температура, тривалість, інтенсивність перемішування асептика	КВП: термометр, реле часу, тахометр, герметичність обладнання	Кожну операцію	37°C 10 год 50-70 об/хв асептично
ТП 7. Виробниче культивування ТП 7. Кт, Кх, Кмб	Режим процесу; температура, тривалість, концентрація бактерій, асептика	КВП: термометр, реле часу прямий висів, візуально, герметичність обладнання	Кожну операцію	37±1°C 16 год 1·10 ⁹ КУО/г асептично
ТП 8. Стабілізація рН культуральної рідини ТП 8. Кт, Кмб	рН культуральної рідини, значення показника асептика	рН-метр герметичність обладнання	Кожну операцію	6.6±0.2 асептично
ТП 9. Охолодження біомаси ТП 9. Кт	Температура культуральної рідини, значення показника	Термометр	Кожну операцію	10-12°C
ТП 10. Фракціонуванн я культуральної рідини ТП 10. Кт, Кх, Кмб	Режим процесу; частота обертання, тривалість, асептика	КВП: тахометр, реле часу герметичність обладнання	Кожну операцію	15 000 об/хв 10 хв асептично
ТП 11 Змішування біомаси із захисним середовищем ТП 11. Кх, Кмб	Захисне середовище, кількість; асептика	Автоматичні дозатори, герметичність обладнання	Кожну операцію	C _{біомаси} :C _{з/с} 1:2 асептично

ТП 12 Заморожування і сублімаційна сушка ТП 12. Кт, Кмб	Режим процесу; температура заморожування, тривалість заморожування, товщина шару біомаси, температура сушіння, тривалість сушіння, величина вакууму, асептика	КВП: термометр, реле часу, автоматичні дозатори, термометр, реле часу, манометр, герметичність обладнання	Кожну операцію	- (60±1)°C 16±2 год 1.5 мм -24-32°C 24 год 10 Па асептично
ТП 13 Подрібнення сухої біомаси ТП 13. Кт, Кмб	Сухий препарат, вологість; повітря, вологість; асептичність	Термогігrometer, термогігrometer герметичність обладнання	Кожну операцію	W=5% W _п =70% асептично
ТП 14 Фасування біомаси ТП 14. Кт, Кмб	Повітря, вологість; точність дозування, асептичність	Термогігrometer, автоматичні дозатори, герметичність обладнання	Кожну операцію	W _п =70% m = 0,5 г асептично
ПМВ 15 Етикетування та групове пакування ПМВ 15. Кт	Готовий препарат, повнота комплектації	Фасувальна машина, візуально	Кожну операцію	по 4 флакони у коробці, 10 коробок / групова тара товарний вигляд готового препарату

4.6. Технологічна схема виробництва

Технологія виробництва препарату складається із наступних принципових стадій: підготовка посівного матеріалу, виробничий біосинтез, охолодження біомаси, відокремлення біомаси, ліофільна сушка препарату з внесеним наповнювачем-стабілізатором, подрібнення та фасування препарату у флакони. Технологічна схема виробництва пробіотичної бактеріальної закваски «Стрептосан» представлена на аркуші формату А1.

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Основна мета процесу виробничого біосинтезу - це отримання максимальної кількості цільового продукту, яким є біомаса асоціації біологічних агентів *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophiles* та *Enterococcus faecium* у межах їхніх генетично детермінованих властивостей за рахунок оптимізації факторів фонового штучно створеного оточуючого середовища у апаратах спеціального призначення – ферментерах.

Ферментацію можна проводити як у рідкому поживному середовищі, так і твердофазне культивування. Серед недоліків останнього слід зазначити: проблеми типового обладнання, значна кількість ручної праці, складність уніфікації. Біосинтез на рідких середовищах можна розділити на поверхневий і глибинний. Поверхневий протікає в кюветах з середовищем. Кювети розташовують у вентильовані повітрям камери. В результаті процесу на поверхні середовища утворюється біомаса у вигляді плівки або твердого шару. Глибинна ферментація відбувається у всьому об'ємі рідкого середовища. Даний вид ферментації здійснюється як періодичним, так і безперервним способами.

При виборі, проектуванні та оптимізації роботи ферментера базовим є врахування фенотипових ознак біологічних агентів. Серед базових вимог (обмежень), які необхідно враховувати при конструюванні або виборі типового ферментера, є наступні:

- гідродинамічна обстановка в ферментері повинна забезпечити одночасну реалізацію масопереносу в двохфазних (поживне середовище –

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Іванова А.О.			РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	Стадія	Аркуш
Консульт.						Д	87
							129
Керівник		Жолнер Л.Г.				КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ	
Затвер.							

клітини біологічного агента), системах;

- технологічне рішення стадії біосинтезу – періодичний процес;

- продуктивність процесу (продуктивність виробництва - потужність) по цільовому продукту і в цьому випадку враховується вид цільового продукту. Продуктивність процесу дозволяє визначити потрібний об'єм, тривалість циклу роботи.

- врахування можливого негативного впливу турбогіпобіозу (зрізових зусиль) на суспендовані клітини або на клітинні агломерати, які найбільш вразливі до зрізових зусиль;

- високі вимоги до рівня асептики в процесі культивування (забезпечення асептики реалізується за рахунок проведення робіт ДР та надійність інженерного оформлення під час культивування) [110];

З точки зору конструктивних особливостей ферментери розрізняються способами підведення енергії і аерації середовища:

- 1) ферментери з підведенням енергії до газової фази;
- 2) ферментери з підведенням енергії до рідкої фази;
- 3) ферментери з комбінованим підведенням енергії.

У ферментерах з підведенням енергії до газової фази аерація і перемішування субстрату відбувається стисненим повітрям.

До таких апаратів відносяться:

- 1) барботажні ферментери. Подача повітря в них здійснюється через барботажні пристрої, які розташовані в нижній частині апарату;
- 2) апарати з дифузором. Змішування субстрату з повітрям, що надходить по розподільних трубах, в даних ферментерах відбувається в нижній частині апарату за допомогою внутрішнього циліндр-дифузора;
- 3) трубчасті ферментери. Під дією потоку повітря рідина циркулює по реактору і сепаратору;
- 4) ферментери з форсунковим розподілом повітря. Повітря в таких ферментерах подається через форсунки, розташовані в нижній частині апаратів;

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		88

5) ферментери колонного типу виконані у вигляді циліндричної колони, яка розділена горизонтальними перегородками на кілька секцій. У таких пристроях повітря барботують через шар рідини кожної тарілки, за рахунок руху рідини через кільцеву щілину забезпечується протитечія двох фаз - газової і рідкої.

До ферментерів з підведенням енергії до рідкої фази відносяться:

- 1) апарати з самовсмоктуючою турбіною складаються з циліндричного дифузора і мішалки з порожніми лопатями і валом. При обертанні мішалки створюється розрідження, яке призводить до підйому рідини в кільцевому зазорі між дифузоровим і стінками апарата з наступним її поверненням в дифузор;
- 2) ферментер з турбоежекторними перемішувачами, які розділені вертикальними перегородками на кілька секцій. У кожній секції є ежектор і дифузор. Переміщення рідини з однієї секції в іншу відбувається через вікна в перегородках.

Ферментери з комбінованим підведенням енергії являють собою циліндричну посудину, усередині якої розташована механічна мішалка і барботер. В апаратах цього типу підведення енергії до газової фази здійснюється для аерації, а до рідкої фази - для перемішування. Перемішування в даних ферментерах здійснюється трьома способами. Апарати з механічним перемішуванням забезпечені механічною мішалкою. Аерація здійснюється шляхом барботажа. Апарати з пневматичним перемішуванням. Перемішування і аерацію підсилюють за допомогою обертювх дисків з отворами або придонних пропелерів. Такі апарати можуть бути також доповнені дифузоровим. В апаратах з циркуляційним перемішуванням рідина циркулює по замкнутому контуру. Рух субстрату надає насос або інший аналогічний пристрій. Ферментери виконані у вигляді циліндра [197].

У даному дипломному проєкті обрано ферментер з введенням енергії механічним перемішувачем. Зважаючи на фізіологічні особливості

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		89

продуцентів, які є факультативними анаеробами, розрахований апарат не передбачає встановлення барботеру, що водночас спрощує конструкцію та полегшує керування процесом. Відсутність барботеру як можливого осередку контамінації виключає необхідність вирішення ряду пов'язаних з ним проблем: можливе засмічення отворів в процесі експлуатації, складність промивання і стерилізації апарату. Таким чином, дане рішення є обґрунтованим та доцільним як з технологічної, так і з економічної точки зору.

Ферментери з комбінованим введенням енергії в свою чергу можна класифікувати за особливостями конструкції як самого реактора так і за особливостями мішалок.

Вибір методу перемішування і апаратури обумовлюється в першу чергу агрегатним станом перемішуючого середовища. Механічні перемішуючі пристрої з обертотворним рухом складаються з власне мішалки, її валу і приводу. Вал може бути встановлений в апараті вертикально, горизонтально або похило.

Механічне перемішування здійснюється за допомогою мішалок, яким передається обертальний рух від електродвигуна. Перемішуючі пристрої можна класифікувати по ряду характерних ознак:

- а) конструктивному пристрою лопатей мішалки (лопатеві, пропелерні, турбінні та спеціальні);
- б) швидкості обертання мішалки (тихохідні - окружна швидкість кінця лопатей приблизно 1 м/с, швидкохідні - окружна швидкість близько 10 м/с);
- в) типу створюваного мішалкою потоку рідини в апараті (забезпечення переважно тангенціальної, радіальної або осьової течії).

Вертикальні циліндричні апарати є стандартизованим найбільш поширеним видом апаратів, що випускаються серійно. Відповідно до ГОСТ 20680-75 існує десять типів виконання вертикальних апаратів із пристроями, що відрізняються формою кришок (днищ) і конструкціями мішалок. Останні представлені 12-ма типами та використовуються в рідкофазних системах.

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		90

З метою вирішення поставленої задачі для забезпечення необхідної температури шляхом інтенсифікації теплообміну при перемішуванні впродовж всього часу культивування обрано дволопатеvu мішалку, яка створює в апаратах тангенціальні і радіальні потоки і відносяться до найпростішого типу механічних мішалок, але, завдяки простоті конструкції, практичності і зручності використання, вони задовольняють поставленій задачі і забезпечують необхідну для продуцентів частоту перемішування у 60-70 об/хв. Вони являють собою обертовий вал, на який, перпендикулярно осі вала, встановлюються дві лопаті прямокутної форми. Вал допустимо розмішувати в ємності як вертикально, так і горизонтально або під нахилом. Лопатеві мішалки прості в обслуговуванні, потребують малих витрат енергії і забезпечують хороше перемішування малов'язких рідин, до яких відноситься знежирене молоко – поживне середовище обраних продуцентів.

Проектований апарат передбачає наявність відбивних перегородок для створення режиму перемішування, коли енергія, введена в культуральну рідину, максимально витрачається на утворення турбулентних пульсацій і забезпечення максимально ефективного теплообміну. Відбивні перегородки являють собою вузькі металеві пластини, прикріплені до внутрішніх стінок ферментера, які запобігають виникненню виру і воронки навколо обертової мішалки, переводячи круговий рух рідини у вихровий, рівномірно розподілений по всьому об'єму.

Ферментери з комбінованим введенням енергії мають вразливе місце для герметизації, яка в свою чергу необхідна для забезпечення необхідного рівня асептики в процесі біосинтезу, у вигляді місця введення валу мішалки в ферментер. Для попередження порушення герметизації використовують торцеві ущільнення з паровим захистом. Випускаються торцеві ущільнення для герметизації валів апаратів, що працюють при надлишковому тиску до 0,25 МПа, температурі середовища – від 30 до 250 °C та швидкості обертання валу до 10 с⁻¹.

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		91

Для реалізації процесу культивування обраний вертикальний апарат з еліптичними кришкою і днищем та дволопатевою мішалкою. Конструкція ферментеру призначена для культивування пробіотичних заквасочних культур. Номінальний об'єм ферментера, що розробляється складає 1 м³. Найкращим матеріалом для виготовлення біореакторів є нержавіюча сталь. Сталеві ємності мають перевагу в герметичності, можуть витримувати великий тиск і порівняно легкі у виготовленні. Саме тому виготовлення ферментерів виконується з високоякісної нержавіючої сталі. Нержавіюча сталь має перевагу завдяки її безпеці і відсутності виділення шкідливих речовин, а також тому, що матеріал не піддається корозії [198].

5.2. Технологічний, конструктивний, тепловий розрахунки

• Конструктивний розрахунок

Мета: визначення розмірів ферментера і його основних конструктивних елементів

Розрахунок виконується виходячи з робочого об'єму (V_p) в тому випадку, коли ферментер працює в періодичному режимі, що відповідає поставленій задачі проектування. Номінальний об'єм ферментера:

$$V_n = V_p / K_3 = 700 / 0,7 = 1000 \text{ л}$$

Розрахований номінальний об'єм відповідає стандартному, а тому подальший розрахунок апарата проводиться відповідно до об'єму у 1 м³.

Приймаємо за ГОСТ 9931-85 апарат з еліптичним відбортюваним днищем номінальною ємністю 1,0 м³:

- внутрішній діаметр 1000 мм;
- висота циліндричної частини – 850 мм;
- загальна висота – 1400 мм.
- товщина стінки 10 мм.

Визначення висоти циліндричної частини ферментера:

$$V_n = V_{\text{циліндричн.}} + 2V_{\text{днища}}$$

$$V_{\text{циліндричн.}} = V_n - 2V_{\text{днища}} = 1 - 2 \cdot 0,1499 = 0,7002 \text{ м}^3,$$

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		92

де $V_{\text{дн}}$ табличне значення відповідно до діаметру D , за ГОСТ 6533-78
 $V_{\text{дн}} = 0,1499 \text{ м}^3$.

$$H_{\text{ц}} = \frac{V_{\text{п}} - 2V_{\text{дн}}}{F} = \frac{1 - 2 \cdot 0,1499}{0,785} \approx 0,892 \text{ м}$$

де F – площа перетину ферментера внутрішнім діаметром, м^2 :

$$F = 0,785 \cdot D_{\text{вн}}^2 = 0,785 \cdot 1^2 = 0,785 \text{ м}^2$$

Приймаємо відповідно до стандартного ряду: $H_{\text{ц}} = 850 \text{ м}$

Діаметр мішалки вибираємо виходячи із співвідношення: $\frac{D}{d_{\text{м}}} = 1,6$

$$d_{\text{м}} = \frac{1}{1,6} = 0,625 \text{ м}$$

Приймаємо відповідно до стандартного ряду: $d_{\text{м}} = 630 \text{ мм}$

Діаметр валу мішалки приймаємо зі стандартного ряду рівним $0,065 \text{ м}$.

Відстань від мішалки до дна апарату знайдемо із співвідношення:

$$\frac{h}{d_{\text{м}}} = 0,4 \dots 1;$$

тоді: $h = \frac{0,630}{1} = 0,630 \text{ м}$

Висота рідини в апараті:

$$H_{\text{к.рід}} = \frac{4 \cdot (V_{\text{р}} - V_{\text{дн}})}{\pi D^2} + h_{\text{дн}} = \frac{4 \cdot (0,7 - 0,1499)}{3,14 \cdot 1^2} + 0,25 = 0,951 \text{ м}$$

Відстань між кромкою мішалки до початку барботера:

$$h_{\text{г}} = 0,25 \cdot d_{\text{м}} = 0,25 \cdot 0,63 = 0,1575 \text{ м}$$

- Розрахунок потужності, яка витрачається при перемішуванні

Процес відбувається в середовищі з твердої, рідкої фази і газової, тобто система складна і гетерогенна. Оскільки подача повітря відбувається одноразово з метою створення надлишкового тиску у апараті для попередження контамінації, подальший розрахунок не включає в себе газову компоненту, а проводиться для монолітної рідини.

Розрахуємо критерій Рейнольдса:

$$Re_{\text{ц}} = \frac{n \cdot d_{\text{м}}^2 \cdot \rho_{\text{р}}}{\mu_{\text{р}}} = \frac{1,17 \cdot 0,63^2 \cdot 1026,095}{0,00159664} = 305\,508,55 = 3,05 \cdot 10^5$$

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		93

де n – частота обертання мішалки. Рух рідини турбулентний ($Re > 10^5$).

З графіка $K_N = f(Re)$ знайдемо приблизний коефіцієнт потужності для $Re_{ц} = 305\,508,55$ для дволопатевої мішалки в посудині з чотирма перегородками: $K_N = 2$

Отже потужність N , що використовується перемішуючим пристроєм на перемішування:

$$N = K_N \cdot \rho_p \cdot n^3 \cdot d_m^5 = 2 \cdot 1026,095 \cdot 1,17^3 \cdot 0,65^5 = 326,195 \text{ Вт}$$

Потужність, яка витрачається на тертя в ущільненні для одинарного торцевого ущільнення:

$$N_{ущ} = 6020 \cdot d_b^{1,3} = 6020 \cdot 0,065^{1,3} = 172,339 \text{ Вт}$$

де d_b - діаметр валу мішалки, приймаємо стандартний – $d_b = 0,065$ м.

Розрахуємо потужність, що витрачається електродвигуном:

$$N_{ел.дв} = \frac{K_n \cdot K_h \cdot \sum K_i \cdot N + N_{ущ}}{\eta} = \frac{1 \cdot \left(\frac{0,951}{1}\right)^{0,5} \cdot 1,2 \cdot 326,195 + 172,339}{0,9} = 615,625 \text{ Вт} = 0,615 \text{ кВт}$$

де $K_n = 1$ (коефіцієнт, що вказує на наявність перегородок в апараті),

$$K_h = \left(\frac{H_p}{D}\right)^{0,5}$$

За отриманими даними обираємо електродвигун 4AA56B4СХУ1 з номінальною потужністю 0,75 кВт.

- Тепловий розрахунок ферментера, що працює в періодичному режимі

Мета: визначення теплового навантаження ферментера і витрат теплоносія

Тепловий баланс

Температура культуральної рідини:

початкова: $t_{крп} = 20$ °С

кінцева: $t_{крк} = t_{пм} = t_{пс} = 37$ °С

Час процесу: $\tau_{проц} = 12$ год

Час перемішування: $\tau_{пер} = 12$ год

Теплота молочнокислого бродіння: 94,2 кДж

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		94

Для спрощення розрахунків приймаємо наступне значення густин: $\rho_{\text{пм}} = \rho_{\text{пс}} = \rho_{\text{р}} = 1026,095 \text{ кг/м}^3$

Питома теплоємність: $C_{\text{пм}} = C_{\text{пс}} = C_{\text{р}} = 3,94 \cdot 10^3 \text{ Дж/кг}\cdot\text{К}$

Виходячи із матеріального балансу виробництва об'єм посівного матеріалу $V_{\text{пм}} = 35 \text{ л (0,035 м}^3\text{)}$, об'єм поживного середовища $V_{\text{пс}} = 665 \text{ л (0,665 м}^3\text{)}$.

Маса поживного середовища:

$$M_{\text{пс}} = \rho_{\text{пс}} \cdot V_{\text{пс}} = 1026,095 \cdot 0,665 = 682,353 \text{ кг}$$

Маса посівного матеріалу:

$$M_{\text{пм}} = \rho_{\text{пм}} \cdot V_{\text{пм}} = 1026,095 \cdot 0,035 = 35,913 \text{ кг}$$

Маса культуральної рідини:

$$M_{\text{к}} = \rho_{\text{р}} \cdot V_{\text{р}} = 1026,095 \cdot 0,700 = 718,267 \text{ кг}$$

Баланс надходжень розрахуємо за наступними формулами:

1. З поживним середовищем:

$$E_{\text{пс}} = M_{\text{пс}} \cdot C_{\text{пс}} \cdot t_{\text{пс}} = 682,353 \cdot 3,94 \cdot 10^3 \cdot 20 = 53\,769\,416,4 \text{ Дж} = 53,769 \text{ МДж}$$

2. З посівним матеріалом:

$$E_{\text{пм}} = M_{\text{пм}} \cdot c_{\text{пм}} \cdot t_{\text{пм}} = 35,913 \cdot 3,94 \cdot 10^3 \cdot 20 = 2\,829\,944,4 \text{ Дж} = 2,829 \text{ МДж}$$

3. Від механічного перемішування:

$$E_{\text{дис}} = N \cdot \tau_{\text{пер}} = 326,195 \cdot 12 \cdot 60 \cdot 60 = 14\,091\,624 \text{ Дж} = 14,092 \text{ МДж}$$

4. Від гетероферментативного молочнокислого бродіння – теплота реакції:

Вміст вуглеводів (лактози) у знежиреному молоці складає близько 4,8 %.

Тоді у $0,665 \text{ м}^3$ поживного середовища вміст лактози: $\frac{0,665 \cdot 4,8}{100} = 0,0319 \text{ м}^3$

Маса лактози:

$$m_{\text{лак}} = V_{\text{лак}} \cdot \rho_{\text{лак}} = 0,0319 \cdot 1525 = 48,678 \text{ кг}$$

Кількість моль лактози у $0,665 \text{ м}^3$ поживного середовища:

$$\nu = \frac{m_{\text{лак}}}{M_{\text{лак}}} = \frac{48,678}{342} = 142,333 \text{ моля}$$

де $M_{\text{лак}}$ - молекулярна маса лактози; $M = 342 \text{ г/моль}$

При бродінні одного моля моносахарида виділяється 94,2 кДж теплоти.

Відповідно при бродінні 142,333 моль дисахариду виділяється:

$$E_{\text{р}} = 142,333 \cdot 2 \cdot 94200 = 26\,815\,537,2 \text{ Дж} = 26,815 \text{ МДж}$$

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		95

Надходження:

$$E_{\text{надх}} = \sum E_i = E_{\text{пс}} + E_{\text{пм}} + E_{\text{дис}} + E_{\text{р}} = \\ = 53\,769\,416,4 + 2\,829\,944,4 + 14\,091\,624 + 26\,815\,537,2 = \\ = 97\,506\,522 \text{ Дж}$$

Баланс витрат розрахуємо за наступними формулами:

1. З культуральною рідиною:

$$E_{\text{кр}} = M_{\text{к}} \cdot C_{\text{р}} \cdot t_{\text{крк}} = 718,267 \cdot 3,94 \cdot 10^3 \cdot 37 = 104\,708\,963 \text{ Дж} = 104,709 \text{ МДж}$$

2. Втрати теплоти:

$$E_{\text{втр}} = 0,02 \cdot E_{\text{кр}} = 0,02 \cdot 104\,708\,963 = 2\,094\,179,26 \text{ Дж}$$

Витрати теплової енергії:

$$\sum E_{\text{витр}} = E_{\text{втр}} + E_{\text{кр}} = 2\,094\,179,26 + 104\,708\,963 = 106\,803\,142,26 \text{ Дж}$$

Визначаємо теплове навантаження теплообмінних пристроїв ферментера:

$E_{\text{т}} = E_{\text{витр}} - E_{\text{надх}} = 106\,803\,142,26 - 97\,506\,522 = 9\,296\,620,26 \text{ Дж}$ – процес нагрівання середовища, тому теплоносій – буде охолоджуватись.

Витрати теплоносія розрахуємо за формулою:

$$G_{\text{т}} = \frac{E_{\text{т}}}{\tau_{\text{проц}} + C_{\text{т}} + \Delta t} = \frac{9\,296\,620,26}{12 \cdot 3600 \cdot 4200 \cdot 2} = 0,0256 \frac{\text{кг}}{\text{с}}$$

де $C_{\text{т}} = 4200 \text{ Дж/кг} \cdot \text{К}$ – теплоємність теплоносія; $\Delta t = 2$ – різниця початкової і кінцевої температур теплоносія.

Об'ємні витрати теплоносія:

$$V_{\text{т}} = \frac{G_{\text{т}}}{\rho_{\text{т}}} = \frac{0,0256}{971,8} = 0,0000263 \frac{\text{м}^3}{\text{с}}$$

де $\rho_{\text{т}} = 971,8 \text{ кг/м}^3$ – густина теплоносія.

- Визначення поверхні теплообміну

Теплофізичні властивості теплоносія – води при температурі 37°C.

Густина води: $\rho = 993,33 \text{ кг/м}^3$

Теплоємність: $C_{\text{р}} = 4174 \text{ Дж/кг} \cdot \text{К}$

Коефіцієнт теплопровідності: $\lambda = 0,630 \text{ Вт/м} \cdot \text{К}$

Коефіцієнт кінематичної в'язкості: $\nu = 0,701 \cdot 10^{-6} \text{ м}^2/\text{с}$

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		96

Площа теплообміну, яку є можливість забезпечити:

$$F_3 = \pi \cdot (D + 2 \cdot s) \cdot H = 3,14 \cdot (1 + 2 \cdot 0,01) \cdot 0,850 = 2,722 \text{ м}^2$$

Визначаємо ширину каналу:

$$a = \frac{D_c - 2\delta_{\text{ст}} - D}{2} = \frac{1,1 - 2 \cdot 0,01 - 1,0}{2} = 0,04 \text{ м}$$

Площа перетину сорочки:

$$f = \frac{\pi(D_c^2 - (D + 2\delta_{\text{ст}})^2)}{4} = \frac{3,14 \cdot (1,1^2 - (1 + 2 \cdot 0,01)^2)}{4} = 0,133 \text{ м}^2$$

Еквівалентний діаметр каналу:

$$d_{\text{екв}} = \frac{2 \cdot a \cdot b}{a + b} = \frac{2 \cdot a \cdot f/a}{a + f/a} = \frac{2 \cdot 0,04 \cdot 0,133/0,04}{0,04 + 0,133/0,04} = 0,079 \text{ м}$$

Швидкість води в сорочці ферментера:

$$w = \frac{G_T}{f \cdot \rho_T} = \frac{0,0256}{0,133 \cdot 993,33} = 1,94 \cdot 10^{-4} \text{ м/с}$$

Критерій Рейнольдса для води, що рухається в об'ємі сорочки:

$$Re = \frac{w \cdot d_{\text{екв}} \cdot \rho_p}{\mu_p} = \frac{1,94 \cdot 10^{-4} \cdot 0,079 \cdot 993,33}{682 \cdot 10^{-6}} = 22,322$$

Оскільки критерій Рейнольдса дорівнює 22,322, то це ламінарний режим.

Критерій Грасгофа знаходимо за рівнянням:

$$Gr = \frac{g \cdot H^3 \cdot \beta \cdot \Delta t}{\nu_T^2} = \frac{9,81 \cdot 0,951^3 \cdot 0,000282 \cdot 2,5}{(0,701 \cdot 10^{-6})^2} = 1,210 \cdot 10^{10}$$

де $g = 9,81 \text{ м}^2/\text{с}$ – прискорення вільного падіння; $H=0,951 \text{ м}$ – рівень культурального середовища в апараті; $\nu_T^2 = 0,701 \cdot 10^{-6} \text{ м}^2/\text{с}$ – кінематична в'язкість води; $\beta=0,282 \cdot 10^{-3} \text{ К}^{-1}$ – коефіцієнт об'ємного розширення;
 $\Delta t = 0,5 \cdot (t_{\text{ст}} - t_{\text{ср}}) = 0,5 \cdot \left(t_{\text{ст}} - \frac{t_6 - t_m}{2} \right) = 0,5 \cdot \left(37 - \frac{|(80-37)-(78-37)|}{2} \right) = 2,5$

Число Релея:

$$Ra = Gr \cdot Pr = 1,210 \cdot 10^{10} \cdot 2,21 = 2,675 \cdot 10^{10}$$

Критерій Нусельта при $Ra > 8 \cdot 10^5$ та $Re \leq 2300$:

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		97

$$Nu = 0,15 \cdot Re^{0,33} \cdot Pr^{0,33} \cdot (Gr \cdot Pr)^{0,1} \cdot \varepsilon_t \cdot \varepsilon_l =$$

$$= 0,15 \cdot 22,322^{0,33} \cdot 2,21^{0,33} \cdot (2,675 \cdot 10^{10})^{0,1} \cdot \left(\frac{2,21}{5,4}\right)^{0,25} \cdot 1 =$$

$$= 4,792$$

де $\varepsilon_t = \left(\frac{Pr_f}{Pr_{ст}}\right)^{0,25}$

Звідки коефіцієнт тепловіддачі:

$$\alpha_1 = \frac{Nu \cdot \lambda}{d_{екв}} = \frac{4,792 \cdot 0,630}{0,079} = 38,215 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}$$

Для визначення коефіцієнта тепловіддачі від середовища до внутрішньої стінки апарату критерій Нуссельта розраховуємо за формулою для турбулентного режиму руху рідини:

$$Nu = 0,021 \cdot Re^{0,8} \cdot Pr^{0,43} \cdot \varepsilon_t \cdot \varepsilon_l =$$

$$= 0,021 \cdot 305\,508,55^{0,8} \cdot 11,24^{0,43} \cdot \left(\frac{11,24}{5,4}\right)^{0,25} \cdot 1 = 1744,458$$

де $\varepsilon_t = \left(\frac{Pr_f}{Pr_{ст}}\right)^{0,25}$

Коефіцієнт тепловіддачі від середовища до внутрішньої стінки апарату:

$$\alpha_2 = \frac{Nu \cdot \lambda}{D} = \frac{1744,458 \cdot 0,546}{1} = 952,474 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}$$

Коефіцієнт теплопередачі розраховуємо за формулою:

$$k = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_1} + \frac{\delta}{\lambda} + \frac{1}{\alpha_2}} = \frac{1}{\frac{1}{38,215} + \frac{0,01}{15} + \frac{1}{952,474}} = 35,862 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2 \cdot \text{К}}$$

Розрахуємо площу поверхні теплообміну за формулою:

$$F_p = \frac{E_{\tau}}{k \cdot \Delta t_{cp} \cdot \tau} = \frac{9\,926\,620,26}{35,862 \cdot 42 \cdot 12 \cdot 3600} = 0,143 \text{ м}^2$$

Розрахуємо дійсну площу поверхні теплообміну:

$$F_d = \pi \cdot D \cdot H_{ц} = 3,14 \cdot 1 \cdot 0,850 = 2,669 \text{ м}^2$$

$F_p < F_d$ – умови теплообміну виконуються, поверхня теплообміну рубашки апарату забезпечить заданий температурний режим протягом його роботи.

Розрахуємо площу поверхні теплообміну за формулою:

$$F_p = \frac{E_{\tau}}{k \cdot \Delta t_{cp} \cdot \tau} = \frac{9\,926\,620,26}{35,862 \cdot 42 \cdot 12 \cdot 3600} = 0,143 \text{ м}^2$$

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		98

Розрахуємо дійсну площу поверхні теплообміну:

$$F_d = \pi \cdot D \cdot H_{\text{ц}} = 3,14 \cdot 1 \cdot 0,850 = 2,669 \text{ м}^2$$

$F_p < F_d$ – умови теплообміну виконуються, поверхня теплообміну рубашки апарату забезпечить заданий температурний режим протягом його роботи.

5.3. Вибір загальнозаводського обладнання

До стадії тонкого очищення повітря пред'являються жорсткі вимоги. На цьому етапі використовуються індивідуальні фільтри, які встановлюються перед кожним ферментером і повинні забезпечувати очищення повітря від частинок діаметром 0,3 мкм на 99,999%. Специфічною вимогою, що ставиться до фільтруючих матеріалів, які застосовуються на даній стадії очистки, є необхідність їх періодичної стерилізації гострою парою разом з усім обладнанням технологічної лінії.

В якості фільтруючих елементів використовують наступні: тонковолокнисті матеріали у вигляді матів, картону і паперу, зернисті жорсткі фільтруючі перегородки (керамічні, металокерамічні, з полімерних матеріалів) і мембранні фільтри. У промислових фільтрах тонкого очищення повітря найбільш часто використовуються тонковолокнисті фільтруючі матеріали.

Волокнисті матеріали зазвичай формують у вигляді матів-пластин з об'ємною часткою волокон близько 0,1. Волокна утримуються або силами тертя, або за допомогою сполучного матеріалу. До цього виду фільтруючих матеріалів можна віднести базальтове волокно, скловату, синтетичні волокна (віскоза, перхлорвініл). Волокнисті матеріали можуть бути оформлені також у вигляді картону і паперу. Для таких матеріалів використовують базальтове супертонке волокно (БСТВ), хлопоасбест, скла, сополімер вінілхлориду і акрилонітрилу. Картон і папір використовуються для ущільнення матів при упаковці їх в фільтри. Волокнисті матеріали дешеві, вони мають малий гідравлічний опір (0,01-0,03 МПа) і велику пилеємність, тому вони вважаються дуже перспективними для мікробіологічної промисловості. Для

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		99

підвищення стійкості до дії гострої пари використовують латексні просочення. Додатково проводять просочення волокон бактерицидними сполуками, наприклад антибіотиками, гексахлорофеном і іншими речовинами.

Високоєфективними фільтруючими матеріалами є азбестово-целюлозні папір і картон. Волокна целюлози товщиною близько 15 мкм служать каркасом, на якому лежать волокна азбесту товщиною в десять частки мікрометра, які утримують частинки.

Пористі матеріали виготовляють з полівінілового спирту, металів, кераміки, ацетилцелюлози. Матеріали цього типу використовуються у вигляді пластин або циліндричних патронів, мають великий термін служби (1,5-2 роки), добре стерилізуються паром. При русі повітря по звивистим порам відбуваються інерційне, дифузійне і інші види осаджень. Пластина з пористих матеріалів товщиною 1 см досить міцна і легко регенерується. Особливою групою мікропористих матеріалів є фільтри «Мілліпор» (США). Розміри пор фільтрів варіюють від 0,005 до 10 мкм. Однак, незважаючи на високі фільтруючі властивості цього матеріалу, він використовується порівняно мало з економічних міркувань, оскільки це пов'язано з необхідністю подачі стисненого повітря більш високого тиску. Циліндричні фільтр-патрони для стерилізації повітря фірми Millipore (діаметр пор 0,45 мкм) погано витримують парову стерилізацію; термін їх служби не перевищує 1 місяця.

Конструктивне оформлення процесу фільтруючої стерилізації повітря залежить від багатьох чинників і в першу чергу від виду матеріалу, яким наповнюють фільтр. Конструкція апарату повинна забезпечувати дві головні вимоги до характеру потоку газу: перпендикулярність напрямку газу до поверхні мату і рух газу тільки через шар матеріалу. Перпендикулярність волокон потоку газу - необхідна умова ефективного осадження. При паралельному напрямку волокон ефективність зменшується на порядок. Для того щоб газ, минаючи матеріал для очищення, не проникав у зазор між

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		100

матеріалом і корпусом або ущільненням, величина зазору повинна бути близько 0,002-0,05 мм, тобто співрозмірна з відстанню між волокнами фільтра.

Для біологічної очистки повітря застосовують глибинні, касетні, фланцеві і з внутрішнім фільтрувальним елементом прямокутної форми [199].

Для насадок з волокнистих матеріалів великої товщини або неміцних при вигині використовуються фланцеві (касетні) апарати; для тонких і гнучких - гільзової (патронної) конструкції. Істотними недоліками фільтрів глибинного типу є невідтворюваність укладання фільтруючого матеріалу і ущільнення його в процесі експлуатації, каналотворення, необхідність часткої зміни набивного матеріалу, небажаний контакт оператора з мінеральним волокном. Для запобігання руху повітря в пристінному шарі фланцевої конструкції кінці матеріалу затискаються у фігурних фланцях, які вільно переміщаються в корпусі і стягуються болтами. В кожній фільтруючій касеті з листового металу укладений диск з волокнистого матеріалу, затиснутий між сітками і відокремлений від фланців гумовими прокладками. В якості індивідуальних фільтрів до ферментерів використовують також фільтри тонкого очищення типу ФТО. Усередині є 73 порожніх стакани (циліндра), в яких укладаються і монтуються елементи з гофрованої тканини Петрянова. У мікробіологічній промисловості в якості індивідуальних фільтрів до ферментерів застосовують і фільтри з гофрованими елементами, в яких між складками фільтруючого матеріалу поміщені гофровані пластини. Недоліками фільтра є неможливість стерилізувати фільтр гострою парою в технологічній лінії, складність його перевірки і герметизації, відсутність механічної міцності самого фільтруючого полотна. До переваг можна віднести високу ефективність фільтруючого матеріалу (понад 99,999%) з частками діаметром 0,3 мкм при невеликому опорі потоку повітря (0,1 МПа) при швидкості фільтрації 0,05 м / с [200].

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		101

Для реалізації поставленої задачі проектування для одноразової подачі стерильного аераційного повітря у ферментер з метою створення надлишкового тиску в апараті для зниження ризиків контамінації зовні в рамках даного дипломного проекту обрано фланцевий фільтр з нержавіючої сталі HST0110 із пропускною здатністю $1,2 \text{ м}^3/\text{хв}$. Робоча температура 150°C (короткочасно до 15 хв до 200°C), тиск – до $16(10)$ бар. Швидка і зручна заміна фільтруючого елементу, простота обслуговування. В якості фільтрувального елементу обрано базальтове супертонке волокно (БСТВ) з діаметром пор $0,5\text{-}2,5 \text{ мм}$, отримане методом роздування первинних базальтових волокон. Шар БСТВ висотою $2,12 \text{ см}$ з щільністю упаковки 100 кг/м^3 є достатнім для стерилізації повітря при швидкості фільтрації $0,1\text{-}0,2 \text{ м/с}$. БСТВ показало кращі експлуатаційні властивості в порівнянні з скловолокнистими матеріалами. Так, наприклад, втрати у вазі після впливу на нього гострої пари при тиску $10\text{-}15 \text{ атм}$ і подальшої вібрації не перевищують $0,2\%$, а втрати у вазі скловолокна № 20 досягають в цих умовах 1% [201].

Розрізняють типи насосів за принципом дії і конструкції. Вони діляться на об'ємні і динамічні насоси. Об'ємні насоси - такі, в яких рідина переміщається за рахунок зміни об'єму камери з рідиною під дією потенціальної енергії. Динамічні насоси - механізми, в яких рідина переміщається разом з камерою під дією кінетичної енергії. Динамічні насоси, в свою чергу, діляться на лопатеві і струменеві. Окремо виділяють види об'ємних насосів за принципом дії в залежності від конструкції:

- Роторні насоси - це цілісний корпус, з певним числом лопатей, що приходять в рух за допомогою ротора.
- Шестеренні насоси - найпростіший тип механізму, що складається з зчеплених між собою шестерень, що приходять в рух під примусовою зміною порожнини між шестернями.
- Імпелерні - в ексцентричний корпус укладені лопаті, при обертанні видавлюють рідина.

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		102

- Кулачкові - насоси, в корпус яких укладені 2 ротора, які при обертанні перекачують рідини різного ступеня в'язкості.

- Перистальтичні - корпус включає еластичний рукав, в якому знаходиться рідина. При обертанні додаткових валиків рідина переміщається по рукаву.

- Гвинтові - насоси, що складаються з ротора і статора. При обертанні ротора рідина починає переміщатися по осі насоса.

Існує також поділ динамічних насосів за принципом дії:

- Відцентрові - включають в себе робоче колесо, усередині якого знаходиться рідина, при обертанні колеса, частинки набувають кінетичну енергію, починає діяти відцентрова сила, під дією якої рідина переходить в корпус мотора.

- Вихрові насоси - за принципом дії аналогічні відцентровим, але менш габаритні і мають більш низький ККД.

- Струменеві - засновані на переході потенційної енергії в кінетичну.

Для транспортування поживного середовища, яким є знежирене молоко, широко застосовують відцентрові самовсмоктувальні насоси. Їх застосовують для перекачування молока з ємностей, розташованих як вище рівня установки насоса, так і нижче його. При перервах в роботі не потрібно заливати їх молоком, так як після закінчення роботи в насосі залишається частина рідини, достатня для його нового пуску [202].

Для реалізації поставленої задачі обрано насос Г2-ОПА, що призначений для перекачування молока, пива, соків, вина і подібних за в'язкістю і хімічною активністю харчових і нехарчових продуктів з температурою не вище 90°C. Насос має наступні характеристики: подача 6 м³/год, напір 10 м, потужність електродвигуна 0,75 кВт. По конструкції насос Г2-ОПА відцентровий, одноступінчатий, консольно-моноблочний, з закритим робочим колесом розбірного типу. Всі деталі насоса Г2-ОПА, що стикаються з рідиною, що перекачується, виконані з нержавіючої сталі і

матеріалів дозволених для застосування в харчовій промисловості. Насос Г2-ОПА встановлюється безфундаментно. Перед пуском корпус насоса і всмоктуючий патрубок заповнюється рідиною. При обертанні робочого колеса, рідина, під дією відцентрової сили, відкидається від центру колеса до периферії і створює тиск в камері насоса Г2-ОПА, в результаті чого рідина надходить в нагнітальний трубопровід, при цьому у всмоктуючому трубопроводі створюється розрідження. Таким чином, встановлюється безперервна подача рідини насосом [203].

5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

З метою виявлення шкідливих і (або) небезпечних виробничих факторів на робочих місцях і здійснення заходів щодо приведення умов праці у відповідність з державними нормативними вимогами охорони праці проводиться атестація робочих місць. Для всіх осіб вступників на роботу, а також працівників, що переводяться на іншу роботу, роботодавець або уповноважена ним особа зобов'язані проводити інструктаж з охорони праці, організовувати навчання безпечними методам і прийомам виконання робіт і надання першої допомоги потерпілим. Забезпечення охорони праці на підприємстві входить в обов'язки роботодавця [204]. У зв'язку з цим роботодавець повинен продемонструвати своє керівництво і зацікавленість в діяльності щодо забезпечення охороною праці на підприємстві і організувати створення системи управління охороною праці, яка є інструментом в здійсненні безперервного вдосконалення діяльності з безпеки та гігієни праці [205].

Однією з основних небезпек, що становить загрозу для працівників біотехнологічних підприємств є патогенні мікроорганізми. Дане біотехнологічне підприємство використовує мікроорганізми, що не становлять загрози здоров'ю людини.

При проектуванні технології біотехнологічного виробництва важливим є наявність типового апаратурного оформлення процесів, обладнання для

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		104

якої схоже до того, що використовується у хімічній і харчовій промисловості. Оскільки процеси необхідно проводити в умовах, що включають в себе досить вузький інтервал температур, тиску та рН, необхідно забезпечити відповідний контроль та керування даних параметрів для запобігання втрати цільового продукту. Важливим є також підтримка асептичності впродовж усього виробничого процесу, що досягається зокрема шляхом герметичності обладнання. При виборі матеріалів апаратів варто враховувати вимогу їхньої кислотостійкості, антикорозійності, виключення можливості інгібування процесів, що проходять у апаратах [206].

У виробничих і допоміжних приміщеннях засобами опалення, вентиляції (або кондиціонування) повинно бути створено сприятливе повітряне середовище: для здоров'я і працездатності персоналу; збереження продуктів і матеріалів; забезпечення технологічного процесу; збереження обладнання. Виробничі процеси повинні відповідати ДСТУ 3273-95. Безпека промислових підприємств. Загальні положення та вимоги. Виробничі та лабораторні приміщення повинні бути забезпечені припливно-витяжною вентиляцією згідно ДСТУ Б А.3.2-12:2009 ССБП Системи вентиляційні. Загальні вимоги.

Розміщення технологічного обладнання повинне проводитися відповідно до технологічної схеми, забезпечувати потоковість технологічного процесу, короткі і прямі комунікації, виключати зустрічні потоки сировини і готової продукції.

Охорона природи і раціональне використання природних ресурсів в умовах їхнього інтенсивного використання є одними з найважливіших економічних і соціальних задач нашої держави. Аналіз відходів багатьох мікробіологічних виробництв свідчить про те, що повітряні і водні викиди в навколишнє середовище необхідно піддавати ретельній очистці.

В даний час відомі і використовуються наступні способи утилізації рідких відходів: біологічний, заснований на переведенні з використанням бактеріальних культур розчинених речовин в тверду фазу з подальшим

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		105

розділенням (фільтрування і сепарації); випарювання стоків – концентрування речовин під дією теплової енергії і подальшим отриманням у реакторі калійного добрива; анаеробний, з використанням безкисневий ферментативний гідроліз органічних речовин з утворення газів; механічний, сепарація і фільтрація рідких відходів. Широко використовується метод очистки стічних вод, заснований на коагуляції і флокуляції, який призводить до нейтралізації заряду клітин, що в свою чергу призводить до когезії і осадженню зважених частин.

Виробництво заквасок бактеріальних повинно здійснюватися відповідно із виконання вимог охорони навколишнього середовища. Контролювання викидів у атмосферу треба здійснювати згідно із ЗУ «Про охорону атмосферного повітря» від 16 жовтня 1992 р. № 2707-XII. Стічні води треба очищати згідно з правилами «Правила охорони поверхневих вод від забруднення зворотними водами», затверджені Міністерством екологічної безпеки України від 02.1999 р. Охорону ґрунту від забруднення побутовими і промисловими відходами треба здійснювати відповідно до СанПиН 42-128-4690-88 «Санитарные правила содержания территорий населенных мест (Санітарні правила щодо утримання територій населених пунктів)», затверджені Міністерством охорони здоров'я СРСР 05.08.88 р., No 4690-88.

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		106

ВИСНОВКИ

1. У проєкті виробництва пробіотичної бактеріальної закваски «Стрептосан» обґрунтовано вибір штамів-продуцентів *Streptococcus thermophilus* 1MB B-7179 та *Enterococcus faecium* L-3, що володіють пробіотичними властивостями, вираженими антагоністичними властивостями по відношенню до широкого кола патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів, високою здатністю до адгезії.

2. Проаналізовано методи селекції промислових штамів-продуцентів пробіотичних заквасок та обрано схему їх отримання шляхом спрямованої селекції видів, виділених з природних джерел існування.

3. Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості продуцентів обрано склад поживного середовища для виробничого біосинтезу на основі знежиреного молока, а також встановлені оптимальні умови культивування: температура $37 \pm 1^\circ\text{C}$, рН $6,6 \pm 0,2$, перемішування 70 об/хв без аерації.

4. Розглянуто особливості кінцевого продукту і методи його одержання, на основі чого складено технологічну схему виробництва бактеріальної пробіотичної закваски «Стрептосан».

5. Обґрунтовано вибір конструкції ферментера об'ємом 1 м^3 із дволопатевою мішалкою. Технологічний та конструктивний розрахунки підтверджують надійність та працездатність апарату.

6. У відповідності до вимог до готової форми та якості продукту, розроблено апаратурну схему виробництва бактеріальної пробіотичної закваски «Стрептосан» у флаконах по 0,5 г.

7. Проєктом передбачені заходи та засоби щодо створення безпечних умов праці та виконання вимог щодо охорони навколишнього середовища.

					ДП БТ6108. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		107